

„Mechanische und pharmakologische Organkonditionierung im Rahmen warmer  
Leberischämie: Bedeutung für den Ischämie-Reperfusionsschaden und die hepatozelluläre  
Regeneration nach partieller Hepatektomie im Tiermodell“

Habilitationschrift  
zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach

Chirurgie

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin

von  
Dr. med. Matthias Glanemann  
geboren am 29.09.1969 in Münster/Westfalen

Dekane: Prof. Dr. med. Joachim W. Dudenhausen  
Prof. Dr. med. Martin Paul

eingereicht am: August 2004

öffentlich-wissenschaftlicher Vortrag am: 23. Mai 2005

Gutachter: 1. Prof. Dr. Michael D. Menger, Homburg/Saar  
2. Prof. Stefan Post, Mannheim

---

## Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung.....	5
1. Partielle Hepatektomie	
2. Ischämie/Reperfusionsschädigung	
3. Strategien zur Protektion vor Ischämie/Reperfusionsschädigung	
3.1. pharmakologische Präkonditionierung (Methylprednisolon)	
3.2. ischämische Präkonditionierung	
B. Fragestellung.....	16
C. Material und Methoden.....	17
1. Versuchstiere, -haltung	
2. Versuchsprotokolle	
2.1 Projekt 1 – IP-Zeitprotokoll	
2.2 Projekt 2 – warme Leberischämie	
2.3 Projekt 3 – warme Leberischämie und partielle Hepatektomie (70%)	
2.4 Projekt 4 – warme Leberischämie und partielle Hepatektomie (90%)	
3. Narkose, Operation	
4. Analysen (Parameter und Analysetechniken)	
4.1 Serumparameter (Albumin, Bilirubin, AST, ALT, GLDH)	
4.2 Histologische Färbung (Hepatozelluläre Schädigung, Mitose Index, Inflammatorisches Infiltrat)	
4.3 Immunhistochemie (TUNEL, Ki67)	
4.4 Myeloperoxidase (MPO)-Gewebskonzentration der Leber	
4.5 Hepatische Mikrozirkulation (Intravitalmikroskopie, Laserdopplerflowmetrie)	

4.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

4.7 Western Blot (Caspase 3)

4.8 Reverse Transkriptase-Polymerase Ketten Reaktion (ICAM-1, Cytochrom C)

4.9 Electrophoric Mobility Shift Assay (NF<sub>κ</sub>B)

4.10 Statistik

## D. Ergebnisse.....41

### 1. Projekt 1 – IP-Zeitprotokoll

1.1 Hepatozellulärer IR Schaden (Serumkonzentrationen AST, ALT, GLDH)

1.2. Zusammenfassung Projekt 1

### 2. Projekt 2 – warme Leberischämie

2.1. Hepatozellulärer IR Schaden (Serumkonzentrationen AST, ALT, GLDH, HE-Färbung)

2.2 Apoptose (Cytochrom C mRNA, Caspase 3 Protein, TUNEL Färbung)

2.3. Inflammation (ICAM-1 mRNA, inflammatorisches Infiltrat, Myeloperoxidase)

2.4. Nukleärer Transkriptionsfaktor NF<sub>κ</sub>B

2.5. Mikrozirkulation (sinusoidale Perfusion, Leukozyten/Endothelzell-Interaktion, NADH-Fluoreszenz, Gallefluß)

2.6. Zusammenfassung Projekt 2

### 3. Projekt 3 – warme Leberischämie und partielle Hepatektomie (70%)

3.1. Resektion und hepatozellulärer IR Schaden (Serumkonzentrationen AST, ALT, GLDH)

3.2. Regeneration (Körpergewicht, Lebergewicht, prozentuales Lebervolumen)

3.3. Regeneration (Ki-67 Färbung, Mitose Index)

3.4. Zusammenfassung Projekt 3

### 4. Projekt 4 – warme Leberischämie und partielle Hepatektomie (90%)

---

4.1. Überleben	
4.2. Laserdopplerflowmetrie	
4.3. Mikrozirkulation (sinusoidale Perfusion, velocity, volumetric blood flow, Leukozyten/Endothel-Interaktion)	
4.4. Zusammenfassung Projekt 4	
 E. Diskussion.....	74
1. pharmakologische Präkonditionierung mit Methylprednisolone (Protektion vor Ischämie/Reperfusionsschädigung, Wirkmechanismus)	
2. Methylprednisolone im Resektionsmodell (Protektion vor Ischämie/Reperfu- sionsschädigung, Regenerationskinetik)	
3. Ischämische Präkonditionierung (IP-Zeitintervall, Protektion vor Ischämie/Reper- fusionsschädigung, Wirkmechanismus)	
4. Ischämische Präkonditionierung im Resektionsmodell (Protektion vor Ischämie/ Reperfusionsschädigung, Regenerationskinetik, Hyperperfusions-Syndrom)	
 Zusammenfassung.....	98
 Literaturverzeichnis.....	102
 Danksagung.....	123

---

## **A. Einleitung**

### **1. Partielle Hepatektomie**

In der Leberchirurgie werden heutzutage vornehmlich primäre oder sekundäre Tumoren operativ entfernt, so daß hierdurch ein maßgeblicher Beitrag zum Behandlungskonzept bei Krebserkrankungen erbracht wird. Aufgrund der hohen Regenerationsfähigkeit der Leber können bis zu 80% des Leberparenchyms reseziert werden, ohne daß lebenswichtige Stoffwechselvorgänge nachhaltig ausgeschaltet werden. Durch hypertrophische und hyperplastische Vorgänge beobachtet man bereits nach 6 Monaten eine komplette Rekonstitution von normal funktionierendem Lebergewebe [Court 2002].

Trotz zahlreicher chirurgischer und intensivmedizinischer Fortschritte kommt es bei einer immer noch erheblichen Anzahl von Patienten zu einem teilweisen oder kompletten Ausfall der Leber während des postoperativen Verlaufs [Seiler 2000, Nagino 2001, Takeda 2002, Morita 2002]. Insbesondere bei vorgeschädigter Leber durch fibrotischen oder zirrhotischen Umbau, oder wenn intraoperativ eine temporäre Drosselung der Blutzufuhr, z. B. wegen zu starken Blutverlustes, erforderlich wird (sogenanntes Pringle-Manöver), kann das verbleibende Parenchym in erheblichem Maße in seiner Funktion beeinträchtigt werden. Dies kann während des postoperativen Verlaufes zu lebensbedrohlichen Komplikationen führen [Ezaki 1998, Mann 2001]. Sekundär können Nierenfunktionsstörungen bis hin zum dialysepflichtigen Nierenversagen, Kreislaufinsuffizienz sowie hämatologische Funktionseinbußen wie Gerinnungsstörungen resultieren. Eine komplette Leberinsuffizienz ist mit dem Leben nicht vereinbar.

Daß die Leber eine erhebliche regenerative Kapazität aufweist, war bereits in der Antike bekannt (Sage des Prometheus). Wie jedoch die hepatozelluläre Regeneration im Detail funktioniert, ist bis heute noch nicht hinreichend erforscht [Fausto 2001]. Normalerweise befindet sich die Leber in einem ruhenden, d.h. nicht proliferierenden Zustand. So durchläuft in Ruhe nur einer von tausend Hepatozyten eine Mitose [Court 2002]. Durch Verlust von

---

Zellmasse, beispielsweise nach chirurgischer Resektion, wird die Leber zum Wachstum stimuliert. Hierbei führen vielfältige Stimuli dazu, daß die Leberzelle aus der G0-Phase in die G1-Phase übertritt und im weiteren Verlauf stufenweise den Zellzyklus komplett durchläuft [Kountouras 2001].

Aufgrund wiederholter Leberresektionen bei Ratten ist bekannt, dass die Leber (im Gegensatz zu anderen Organen) eine nahezu unlimitierte regenerative Kapazität aufweist [Court 2002]. Dennoch ist ein ausgewogenes Verhältnis von positiven und negativen Stimuli erforderlich, um die Proliferation von Hepatozyten zu regulieren. So existieren pro-regenerative Wachstumsfaktoren wie EGF, HGF oder TGF- $\alpha$ , während TGF- $\beta$  oder Activin als inhibitorische Wachstumsfaktoren identifiziert wurden [Fausto 2001]. Beide Arten von Wachstumsfaktoren werden nach partieller Hepatektomie vermehrt exprimiert und garantieren durch ein sensibles Gleichgewicht eine kontrollierte Zellproliferation [Court 2002, Fausto 1995]. Ist die ursprüngliche Größe wieder erreicht, stoppt automatisch der Wachstumsprozeß [LaBrecque 1994].

Nur ein voll funktionsfähiger Leberlappen, der den Stoffwechselbedürfnissen des Patienten in ausreichendem Maße Genüge trägt, erlaubt eine vollständige Rekonvaleszenz. Umfassende Untersuchungen sind daher erforderlich, um die Funktionsreserven der Leber, das noch tolerable Resektionsausmaß sowie die Regenerationsfähigkeit des Restparenchyms möglichst sicher vor einer Operation einschätzen zu können, um gegebenenfalls - bei zu hohem Operationsrisiko - von der Resektion Abstand nehmen zu können.

---

## 2. Ischämie/Reperfusionsschädigung

Bei starkem intraoperativen Blutverlust an der Resektionsfläche kann mitunter eine temporäre Drosselung der Blutzufuhr erforderlich werden. Hierbei werden sämtliche im Ligamentum hepatoduodenale befindlichen Strukturen (A. hepatic propria, V. portae, Ductus choledochus) vorübergehend vollständig abgeklemmt. Dieser Vorgang wird auch als Pringle Manöver bezeichnet [Pringle 1908]. Es resultiert hierbei sowohl eine bessere Übersicht im Rahmen der Parenchymdissektion als auch eine Reduktion der erforderlichen intraoperativen Bluttransfusionen [Heriot 2002]. In mehreren Arbeiten konnte insbesondere die vermehrte Gabe von Bluttransfusionen als unabhängiger Prediktor für ein verringertes Patientenüberleben ausgemacht werden [Makuuchi 1989, Kooby 2003].

Allerdings impliziert die Durchführung eines Pringle Manövers eine temporäre Gewebshypoxie. Sowohl die Hypoxie als auch die nachfolgende Reperfusion können eine hepatozelluläre Schädigung hervorrufen. Diese Form der Organschädigung wird als Ischämie/Reperfusionsschädigung bezeichnet. Die dabei liegenden pathophysiologischen Mechanismen sind komplex und stellen ein multifaktorielles Geschehen dar. Eine Vielzahl von Zelltypen bzw. zellulären Interaktionen sind hierbei involviert. Auch wenn in der Hauptsache Kupffer-Zellen und sinusoidale Endothelzellen angesprochen werden, sind viele der zugrunde liegenden Mechanismen noch unklar und Gegenstand der aktuellen Forschung [Jaeschke 1996, Lemasters 1997, Bilzer 2000, Serracino-Inglott 2001, Kim 2003, Teoh 2003, Arai 2003].

Im Rahmen der Ischämie führt der mitochondriale ATP-Verlust bei anaerober Stoffwechsellage zu einem konsekutiven Zusammenbruch des Ruhemembranpotentials. Die Membranpermeabilität steigt und resultiert in einer zunehmenden zytoplasmatischen Schwellung. Zusätzlich häuft sich das Endprodukt der anaeroben Glykolyse (Laktat) an, welches eine lokale metabolische Azidose bewirkt. Dies betrifft alle Zelltypen der Leber und

führt je nach Dauer der Ischämie zu einer temporären Zellschädigung bis hin zum irreversiblen Zelltod (Abbildung 1) [Clavien 1992].

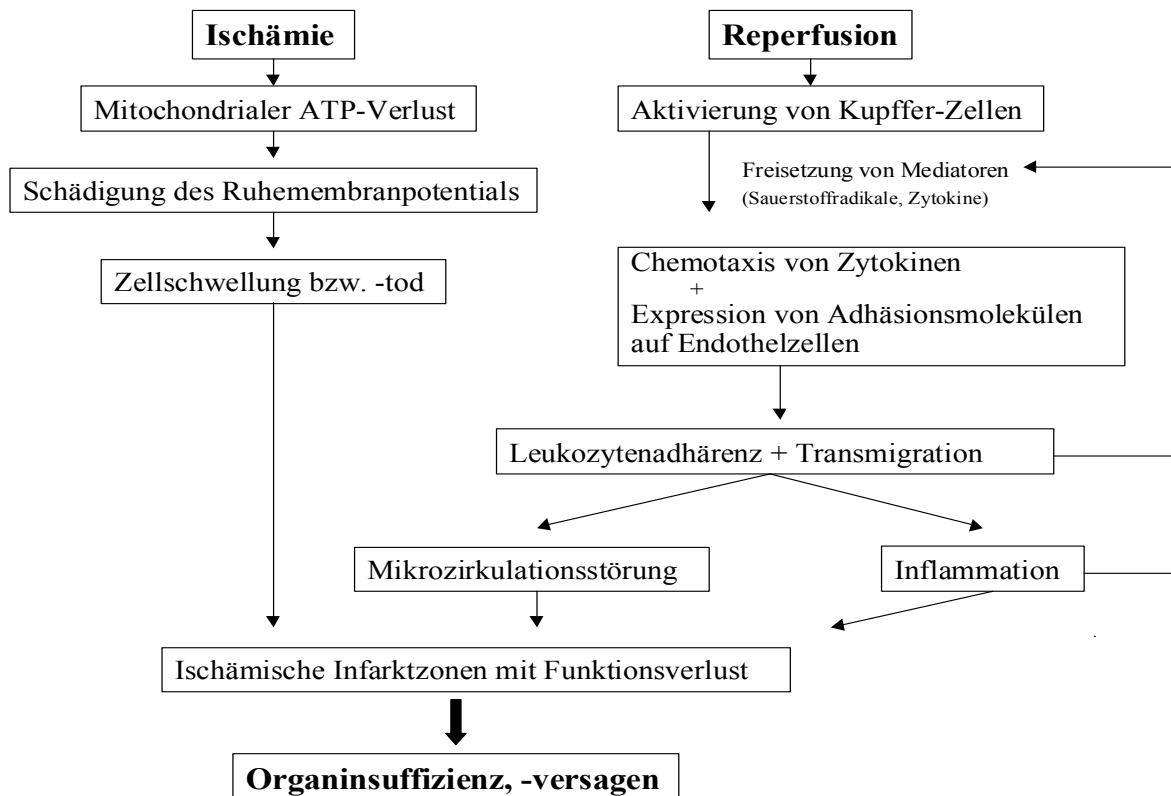


Abbildung 1: Pathophysiologie des hepatischen Ischämie/Reperfusionsschaden [Glanemann 2003]

Bei der anschließenden Reperfusion scheinen im wesentlichen drei Hauptkomponenten für die Entwicklung der hepatischen Schädigung verantwortlich zu sein. Zum einen die direkte Schädigung von sinusoidalen Endothelzellen, die Zunahme der Leukozyten- und Thrombozytenadhäsion am Endothel nach vermehrter Expression von Adhäsionsmolekülen sowie die Sequestration von Leukozyten in das Gewebe [Jaeschke 1996, Clavien 1998, Lentsch 2000].

Der Aktivierung von Kupffer-Zellen kommt dabei eine wesentliche Rolle zu (Abbildung 1) [Jaeschke 1996, Bilzer 2000, Arai 2003]. Kupffer-Zellen machen ca. 80-90% der



---

gewebsständigen Makrophagen in der Leber aus. In der initialen Phase kommt es aus den Kupffer-Zellen zu einer Freisetzung von zytotoxischen Sauerstoffradikalen, die vornehmlich Endothelzellen schädigen [Clavien 1998, Bilzer 2000].

Zusätzlich zur Komplementaktivierung wird in der initialen Phase nach Reperfusion eine massive Freisetzung von Zytokinen wie Interleukin (IL)-1, IL-6, IL-12, platelet activating factor (PAF) und Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) beobachtet [Mueller 1996, Jaeschke 1996]. TNF $\alpha$  und IL-1 sind an der Freisetzung weiterer chemotaktisch wirkender Mediatoren (z.B. IL-8) sowie an der Expressionssteigerung von Adhäsionsmolekülen wie intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular adhesion molecule-1 (VCAM-1) oder P-Selektin auf vaskulären Endothelzellen beteiligt [Jaeschke 1997, Bilzer 2000]. Es kommt zu einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen und zu einer gesteigerten Interaktion zwischen Leukozyten und Endothelzellen, so daß eine erhöhte Adhärenz von Leukozyten an vaskulären Endothelzellen nachgewiesen werden kann [Jaeschke 1997, Lentsch 2000, Martinez-Mier 2000, Arai 2003]. Infolge von Transmigration wandern vermehrt Leukozyten in das hepatische Interstitium [Vollmar 1994], so daß eine lokale inflammatorische Reaktion im Gewebe nachweisbar wird [Jaeschke 1996, Lentsch 2000]. Hierbei werden wiederum zytotoxische Mediatoren und Sauerstoffradikale frei, die direkt Endothelzellen und Hepatozyten schädigen. Insbesondere die Aktivierung von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) führt in erheblichem Maße zur Ausbildung von zytotoxischen Sauerstoffradikalen. Auch sind die in den PMN enthaltenen Proteasen wie Elastase, Catepepsin G, Kollagenase und hydrolytische Enzyme zelltoxisch [Lentsch 2000].

Die Mikroperfusion wird nach Reperfusion deutlich beeinträchtigt. So wird eine drastische Perfusionsstörung durch geschädigte Endothelzellen und extrazelluläre Matrix-Proteine beschrieben. Ebenso wie Leukozyten lagern sich auch vermehrt Thrombozyten an der Oberfläche der Endothelzellen an. Es resultieren Mikrothromben durch Leukozyten- und Plättchenaggregation [Martinez-Mier 2000]. Dieser Vorgang wird durch Freisetzung von PAF

aus aktivierten Kupffer-Zellen, Leukozyten und Thrombozyten unterstützt. Der Verlust der Endothelzellintegrität hat in diesem Zusammenhang einen zusätzlichen thrombogenen Einfluss. Eine Flußverlangsamung bis hin zur kompletten Stase ist das Resultat, die Folge sind ischämische Infarktzone mit Funktionsverlust des Leberparenchyms [Martinez-Mier 2000].

Die beschriebenen pathophysiologischen Veränderungen im Rahmen der Ischämie/Reperfusionsschädigung bedingen eine teilweise oder komplette Organinsuffizienz. Hierbei kann das klinische Ausprägungsbild beim Patienten je nach Intensität der Schädigung variieren. Erhöhte Serumtransaminasen, reduzierte bis fehlende Galleproduktion und damit erhöhtes Serumbilirubin, erniedrigte Gerinnungsfaktoren oder Serumalbuminspiegel sind als Folge der beeinträchtigten Entgiftungs- und Synthesefunktion zu beobachten.

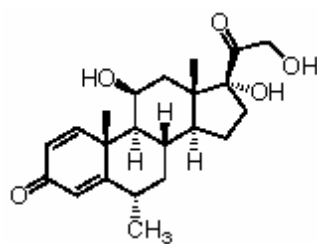
Dabei scheint es unerheblich zu sein, ob der ischämische Insult gesundes oder bereits vorgeschädigtes Gewebe trifft, in jedem Fall ist eine hepatozelluläre Funktionseinbuße zu verzeichnen, was wiederum zu einer unzureichenden Regeneration nach Leberresektion führen kann. Dabei stellt die postoperative Leberinsuffizienz ein lebensbedrohliches Problem dar. Sie kann sich klinisch manifestieren als partielle Leberinsuffizienz mit sekundären Funktionseinbußen (wie hepatorenales oder hepatopulmonales Syndrom), die den Patienten tage- bis monatelang an die Intensivstation binden, oder als vollständige Leberinsuffizienz, die mit dem Leben nicht vereinbar ist [Strasberg 1994, Takeda 2002, Wei 2003].

Dass aufgrund der Ischämie/Reperfusionsschädigung auch die Regenerationskapazität nach partieller Hepatektomie eingeschränkt ist, scheint auf der Hand zu liegen. Für eine genaue Quantifizierung liegen in der Literatur jedoch keine Daten vor. So wird weitläufig angenommen, daß eine gesunde humane Leber eine warme Ischämie ohne Unterbrechung bis maximal 60 min tolerieren kann [Bismuth 1989].

### 3.Strategien zur Protektion vor Ischämie/Reperfusionsschädigung

#### 3.1. pharmakologische Präkonditionierung (Methylprednisolon)

Glukokortikoide sind in der heutigen Zeit aufgrund ihres antinflammatorischen, antiphlogistischen und antiproliferativen Charakters aus dem klinischen Alltag nicht mehr wegzudenken. Sie finden Anwendung bei einer Vielzahl von Erkrankungen zu denen vor allem allergische Erkrankungen, Autoimmunerkrankungen und die Substitutionstherapie bei Nebenniereninsuffizienz gehören. Methylprednisolon ist ein synthetisch hergestelltes Glukokortikoid-Derivat, welches durch Methylierung des Steroidgerüsts eine verlängerte und verstärkte Wirkung besitzt.



Methylprednisolon

Abbildung 2: Struktur des Methylprednisolon

Der entzündungshemmende Effekt der Glukokortikoide ist bedingt durch eine verminderte Synthese von Entzündungsmediatoren (Interleukinen) sowie durch Beeinflussung der Phospholipase A<sub>2</sub>, wobei es zu einer Blockade der Freisetzung von Prostaglandinen und Leukotrienen kommt [Barnes 1998].

Glukokortikoide haben einen zytoplasmatischen Rezeptor, der im inaktivierten Zustand zu einem Proteinkomplex zusammengefasst ist. Die Bindung des Glukokortikoids bewirkt eine Konformationsänderung und somit über den im Kern translozierten Rezeptor eine Änderung der Transkriptionsrate von sensiblen Genen. Weiterhin kann es zu einer direkten Beeinflussung des Transkriptionsfaktors NF<sub>κ</sub>B und Aktivatorprotein-1 (AP-1)

kommen, die bei der Regulierung von inflammatorischen Genen eine Rolle spielen. Der hemmende Einfluß auf Zytokine betrifft vor allem IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-6, IL-11 und TNF $\alpha$ . Auch Chemokine, wie IL-8 und MIP1 $\alpha$  werden vermindert gebildet, was zu einer weiteren Inhibition der inflammatorischen Kaskade führt. Die Wirkung auf Adhäsionsmoleküle wird indirekt über verminderte Expression von IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  vermittelt. Bei ICAM-1 und E-Selectin soll es sich allerdings um eine direkte Änderung der Transkriptionsrate handeln [Barnes 1998, Almawi 2002].

Aufgrund der starken anti-inflammatorischen Eigenschaften von Glukokortikoiden stellt folglich die pharmakologische Organkonditionierung durch Gabe von Methylprednisolon (MP) einen möglichen Ansatz zur Protektion vor Ischämie/Reperfusionsschädigung dar [Pachter 1979, Blumhardt 1986, Shimada 1996, Yamashita 2001].

Erste Berichte zur Steroidprotektion erfolgten bereits Mitte der 70er Jahre. Santiago-Delpin et al. beschrieben 1975, daß eine Vorbehandlung der Leber mit Steroiden vor einer nachfolgenden Ischämie/Reperfusionsschädigung schützen kann. Ihre experimentellen Untersuchungen konnten die Autoren eindrucksvoll mit klinischen Daten bestätigen [Santiago-Delpin 1975, Figueroa 1975]. Es konnte ferner gezeigt werden, daß nach präoperativer Gabe von MP die postischämische Proteinsynthese schneller und effizienter ablief als in ischämischen Kontroll-Tieren [Fornander 1984]. Wenngleich die pathophysiologischen Hintergründe noch unklar waren, wurde in den nachfolgenden Jahren Kortison bereits routinemäßig bei traumatologischen Patienten mit einer operationspflichtigen Leberverletzung vor Durchführung eines Pringle-Manövers verabreicht [Pachter 1979, Pachter 1992].

Erst jüngere Untersuchungen legten dar, daß die postischämische Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen, die zur Ausbildung des hepatischen Ischämie/Reperfusionsschadens führen, durch Steroidapplikation reduziert wird [Shimada 1996, Barnes 1998, Yamashita 2001]. Darüberhinaus scheinen Steroide einen protektiven und

stabilisierenden Einfluß auf die Zellmembran zu haben [Wang 2001]. Die genauen pathophysiologischen Mechanismen der Gewebsschutz im Rahmen der Ischämie/Reperfusionsschädigung sind bisher jedoch nicht hinreichend geklärt [Valen 2000].

### 3.2. ischämische Präkonditionierung

Weitere Strategien zur Protektion vor Ischämie/Reperfusionsschädigung sind bisher untersucht worden [Teoh 2003]. Demnach ist neben der Gabe von Glukokortikoiden, der Verbesserung der Mikrozirkulation durch Gabe von NO-Donatoren [Kubes 1994] und Antikörpern gegen Adhäsionsmoleküle [Kuzume 1997, Yadav 1998] oder neben der Erhöhung der Ischämietoleranz durch Blockade von Sauerstoffradikalen durch Glutathion [Bilzer 1999] auch eine mechanische Konditionierung der Leber, die sogenannte ischämische Präkonditionierung, als erfolgreiches Instrument zur Leberprotektion beschrieben worden [Hawaleshka 1998, Teoh 2003].

So wurde gezeigt, daß kurze, kontrollierte Perioden der vaskulären Okklusion mit nachfolgender Reperfusion vor einer längeren Gewebsischämie schützend wirken können [Peralta 1997, Yoshizumi 1998, Yin 1998, Belghiti 1999]. Ischämische Präkonditionierung (IP) bedeutet, daß *eine* zusätzliche, kontrollierte Gewebsischämie mit konsekutiver Reperusionsphase der eigentlichen, im Rahmen der Operation anfallenden Ischämie vorgeschaltet wird [Hawaleshka 1998], wohingegen beim „intermittend clamping“ *mehrere* Phasen von Ischämie und Reperfusion vorgeschaltet werden [Belghiti 1999]. Wenngleich sich die Netto-Dauer der Gesamtischämiezeit bei beiden Techniken erhöht, resultierte eine Organprotektion durch Erhöhung der Ischämietoleranz, wie in zahlreichen Studien für beide Techniken belegt werden konnte [Hardy 1996, Peralta 1997, Peralta 1999, Belghiti 1999].

Das Phänomen der IP wurde erstmalig von Murrey et al. am Herzen beschrieben und von diesen mit dem Begriff des „ischemic preconditioning“ (IP) bezeichnet [Murrey 1986]. Die protektiven Effekte von IP wurden auch von anderen Forschern an verschiedenen Species wie Schwein [Scott 1992], Kaninchen [Downey 1993] und Ratten [Yellon 1992] nachgewiesen. Im besonderen konnte gezeigt werden, daß Herz, Leber, Nieren und Dünndarm von einer solchen Vorbehandlung profitieren und gegenüber einer Ischämie/Reperfusionsschädigung geschützt werden [Kume 1996, Hotter 1996, Hardy 1996, Ogawa 1998, McCallion 2000].

Obgleich die genauen protektiven Mechanismen dieser Vorbehandlung nicht eindeutig geklärt sind, gibt es Hinweise darauf, daß die Aktivierung von ATP-abhängigen Kaliumkanälen [Thornton 1993, van Winkle 1994] sowie Adenosin A1-Rezeptoren [Peralta 1999], die Induktion von ‚heat shock‘ Proteinen (HSP 32/ =heme oxygenase-1 (HO-1) und HSP 70) [Kume 1996, Amersi 1999] und Stickstoffmonoxid (nitric oxide, NO) eine entscheidende Rolle beim Zellschutz spielen [Peralta 1996, Kobayashi 1995]. Trotz zahlreicher Ansätze, die pathophysiologischen Mechanismen der IP zu erklären, sind die genauen Vorgänge noch ungeklärt und weiterhin Gegenstand der wissenschaftlichen Forschung.

---

## **B. Fragestellung**

Angesichts der zuvor beschriebenen Problematik im Rahmen von Leberresektionen mit Pringle-Manöver ergibt sich unter der Zielsetzung, die postoperativen Ergebnisse verbessern zu wollen, folgende Hypothese: Wenn es gelingt, die Ischämie/Reperfusionsschädigung, die durch die transiente Organischämie während der Operation erzeugt wird, zu reduzieren, müsste demzufolge auch die Regeneration des verbleibenden Leberparenchyms schneller und effizienter ablaufen [Teoh 2003].

Es ergeben sich daher folgenden Fragen, die in der vorliegenden Arbeit durch eine systematische wissenschaftliche Analyse geklärt werden sollen.

1. Kann die hepatozelluläre Ischämie/Reperfusionsschädigung nach warmer Organischämie durch pharmakologische oder mechanische Organkonditionierung signifikant im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen reduziert werden?
2. Können für eine mögliche Organprotektion pathophysiologische Mechanismen eruiert werden?
3. Falls eine Organprotektion erfolgt, ist diese auch bei einer regenerierenden Leber nach partieller Hepatektomie vorhanden?
4. Werden proliferative Vorgänge im Rahmen der Regeneration nach partieller Hepatektomie durch pharmakologische oder mechanische Organkonditionierung beeinflusst?



## C. Material und Methoden

### 1. Versuchstiere, -haltung

Die Genehmigung aller hier aufgeführten Versuche erfolgte durch das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin mit Zustimmung des örtlichen Tierarztes.

Für die Versuche wurden männlichen Wistar-Ratten (Gewicht ca. 200–300 g) der Fa. Harlan-Winkelmann, Borcheln, Deutschland verwandt. Das Akklimatisierungsintervall zwischen Eintreffen der Tiere und Versuchsbeginn betrug mindestens eine Woche. Die Tiere wurden unter konstanten Temperaturbedingungen bei 20 bis 24°C zu fünf Tieren pro Käfig im Forschungshaus der Charité, Humboldt-Universität Berlin, Campus Virchow-Klinikum, untergebracht. Sie hatten freien Zugang zu Futter und Trinkwasser *ad libitum* und einen natürlichen Tag-/ Nachtrhythmus.

### 2. Versuchsprotokolle

#### 2.1 Projekt 1 – IP-Zeitprotokoll

Verschiedene Zeitprotokolle sind bisher in der Literatur benutzt worden, um die Effizienz der IP-Behandlung zu untersuchen. Daher wurde zunächst systematisch der Einfluß der Dauer der Ischämie- bzw. der Reperfusionsphase im Rahmen der IP-Behandlung auf die Intensität des hepatischen IR Schadens analysiert. Letzterer wurde anhand der postischämischen Ausschüttung der Serumenzyme AST, ALT und GLDH quantifiziert. Diese Voruntersuchungen dienten der Festlegung eines optimalen IP-Zeitprotokolls für die nachfolgenden Versuche.

Die Leberischämie betrug bei allen Tieren 45 min, abgesehen von einer Kontrollgruppe (sham operation). Diese Zeitspanne ist ausreichend, um einen signifikanten hepatozellulären Schaden zu induzieren, wobei gleichzeitig gewährleistet ist, daß diese

Schädigung mit dem Leben vereinbar ist, so daß alle Versuchstiere überleben. Die untersuchten IP-Zeitintervalle sind in der nachfolgenden Tabelle angegeben (Tabelle 1). Die Enzymkonzentrationen wurden 24 h nach Leberischämie im Serum der Tiere gemessen.

IP Intervall (in min)	warme Leberischämie (in min)	Zeitpunkt der Messung (h nach Reperfusion)	n =
0	0	24	9
0	45	24	11
5/5	45	24	8
5/10	45	24	8
5/15	45	24	8
5/30	45	24	8
5/45	45	24	5
15/30	45	24	8
10/10	45	24	8

Tabelle1: Projekt 1 / verschiedene IP-Zeitintervalle

## 2.2 Projekt 2 – warme Leberischämie

Im zweiten Projektabschnitt wurde der Einfluß von IP und MP auf den IR Schaden der Leber nach warmer Organischämie untersucht. Drei Behandlungsgruppen wurden dabei unterschieden. In der ersten Gruppe wurde keine Vorbehandlung vor der Leberischämie durchgeführt, so daß diese Gruppe als unbehandelte, ischämische Kontrollgruppe fungierte. Die zweite Gruppe wurde mittels IP vorbehandelt, wobei das effizienteste IP-Zeitprotokoll

aus Projekt 1 angewandt wurde. In der dritten Gruppe erfolgte eine pharmakologische Präkonditionierung mit Methylprednisolon (MP) in einer Dosierung von 30 mg/kgKG, welches 2-3 min vor Induktion der Leberischämie über die Penisvene appliziert wurde. Die Leberischämie betrug bei allen Tieren 45 min.

- |    |                                     |                        |
|----|-------------------------------------|------------------------|
| 1. | unbehandelte, ischämische Kontrolle | + 45 min Leberischämie |
| 2. | IP-Vorbehandlung                    | + 45 min Leberischämie |
| 3. | MP-Vorbehandlung                    | + 45 min Leberischämie |

Die Analyse von Blut und Lebergewebe erfolgte vor der Behandlungsphase (baseline), unmittelbar nach der Reperfusion (0 h), sowie 3, 6 und 24 h nach Reperfusion (n=8 pro Zeitpunkt und Gruppe). In dieser Versuchsreihe wurde das Ausmaß der IR Schädigung anhand der Serumkonzentrationen von AST, ALT und GLDH sowie der morphologischen Schädigungsmuster in der histologischen Übersichtsfärbungen mit Hämatoxylin-Eosin (HE) bestimmt. Desweiteren wurde die postischämische apoptotische Aktivität mittels Western Blot-Nachweis von Caspase 3, rt-PCR-Nachweis von Cytochrom C und TUNEL-Färbung analysiert und quantifiziert. Ebenso wurde die postischämische inflammatorische Aktivität in der Leber anhand des rt-PCR-Nachweis von ICAM-1 und des Myeloperoxidasegehaltes (MPO) in der Leber bestimmt. Zusätzlich erfolgte die Auszählung der inflammatorischen Zellen (polymorphkernige Leukozyten, Monozyten, Lymphozyten) im Lebergewebe. Auf transkriptioneller Ebene wurde die Bindungsaffinität und damit die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B mittels Electrophoric Mobility Shift Assay (EMSA) bestimmt. Die Intravitalmikroskopie erfolgte zur Analyse weiterführender pathophysiologischer Untersuchungen bei IP-behandelten und unbehandelten, ischämischen Kontrollen.

### 2.3 Projekt 3 – warme Leberischämie und partielle Hepatektomie (70%)

Im dritten Projekt wurde der Einfluß von IP und MP auf die hepatozelluläre Regeneration nach 70%-iger Leberresektion (LTR) bei gleichzeitiger warmer Organischämie untersucht. Die warme Leberischämie betrug bei allen Tieren 30 min, während derer die Resektion durchgeführt wurde. Eine 70%-ige Leberresektion (selbst in Kombination mit 30 min warmer Ischämie) garantiert ein 100%-iges Überleben der Tiere, so daß regenerative Vorgänge gut zu untersuchen sind.

Es wurden drei Behandlungsgruppen untersucht. In der Kontrollgruppe wurde die Resektion unter Ischämie durchgeführt. Eine Vorbehandlung erfolgte hier nicht, so daß diese Tiere als nicht-behandelte, ischämische Kontrolltiere fungierten. In der IP-Gruppe wurde die Organkonditionierung mit dem effizientesten IP-Zeitprotokoll aus Projekt 1 durchgeführt. Methylprednisolon wurde in einer Dosierung von 30 mg/kgKG 2-3 min vor Induktion der Leberischämie bzw. -resektion über die Penisvene appliziert.

- |    |                                     |  |
|----|-------------------------------------|--|
| 1. | unbehandelte, ischämische Kontrolle | + 30 min Leberischämie + 70% Resektion |
| 2. | IP-Vorbehandlung                    | + 30 min Leberischämie + 70% Resektion |
| 3. | MP-Vorbehandlung                    | + 30 min Leberischämie + 70% Resektion |

Zur Quantifizierung des IR-Schadens wurde 6 h postoperativ aus der Schwanzvene Blut entnommen und die Serumenzyme AST, ALT und GLDH bestimmt. Die weitere Analyse von Blut und Lebergewebe zur Beurteilung der regenerativen Vorgänge erfolgte an Tag 1, 4 und 7 nach der Operation (n=8 pro Zeitpunkt und Gruppe). Hierzu wurden mittels Immunhistochemie Ki-67 positive Hepatozyten nachgewiesen. Anhand von HE-Färbungen wurde die Anzahl der mitotischen Zellen pro 2000 Hepatozyten ausgezählt. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung der Serumkonzentrationen von AST, ALT, Bilirubin und Albumin. Ebenso wurde in allen Gruppen das Gewicht der regenerierenden Restleber bezogen auf das

jeweilige Körpergewicht an den entsprechenden postoperativen Tagen gemessen und analog zum Gesamt-Körpergewicht zwischen den Gruppen verglichen.

#### 2.4 **Projekt 4** – warme Leberischämie und partielle Hepatektomie (90%)

Im Gegensatz zur 70%-igen Resektion stellt die 90%-ige Leberresektion eine subletale Kondition dar. Daher wurde in dieser Versuchsreihe eine Überlebensanalyse durchgeführt, um Rückschlüsse auf die Regeneration nach IP- bzw. MP-Behandlung ziehen zu können (n=10 pro Gruppe). Desweiteren erfolgte die Analyse der frühen postischämischen Mikrozirkulation mittels IVM und Laserdopplerflowmetrie (n=8 pro Gruppe). Hierbei wurde der Einfluß der postischämischen Mikrozirkulation auf die Regeneration in ausgedehnt resezierten, sogenannten small-for-size Lebern analysiert. Die warme Leberischämie betrug bei allen Tieren 30 min, während derer die Resektion durchgeführt wurde.

Es wurden drei Behandlungsgruppen untersucht. In der Kontrollgruppe wurde die Resektion unter Ischämie durchgeführt. Eine Vorbehandlung erfolgte nicht, so daß diese Tiere als nicht-behandelte, ischämische Kontrolltiere fungierten. In der IP-Gruppe wurde die Organkonditionierung mit dem effizientesten IP-Zeitprotokoll aus Projekt 1 durchgeführt. In Gruppe 3 wurde Methylprednisolon in einer Dosierung von 30 mg/kgKG 2-3 min vor Induktion der Leberischämie bzw. -resektion über die Penisvene appliziert.

- |    |                                     |  |
|----|-------------------------------------|--|
| 1. | unbehandelte, ischämische Kontrolle | + 30 min Leberischämie + 90% Resektion |
| 2. | IP-Vorbehandlung                    | + 30 min Leberischämie + 90% Resektion |
| 3. | MP-Behandlung                       | + 30 min Leberischämie + 90% Resektion |

### 3. Narkose, Operation

#### Materialien/Geräte

##### Operationsinstrumente

##### Mikrochirurgische Instrumente

##### Nahtmaterial:

Ethicon® Vicryl 3-0

Johnson & Johnson, Intl, SA8JQBB0

Prolene® 6-0

Ethicon®, Norderstedt, D, JL4HQPBB

Resolon® 3-0

Resorba®, Nürnberg, D, REF 881519

##### Narkosegerät

#### Reagenzien

Isoflurane

Abbott GmbH, Wiesbaden, D

Methylprednisolon

Aventis Pharma, D

Pentobarbital

Abbott, USA

Ketanest

Parke-Davis GmbH, Berlin, D

Xylacin

Rompun®, Bayer, Leverkusen, D

Die Narkoseeinleitung der Tiere erfolgte durch intraperitoneale Injektion von Pentobarbital (Dosierung: 25-45 mg/kg Körpergewicht). Dieses nur hypnotisch wirkende Barbiturat wurde in Versuch 1 durch eine i.m. Narkose mit Ketanest und Xylacin ergänzt. Hierzu wurde Ketanest/Xylacin 2% im Verhältnis 1:4 intramuskulär mit einer Konzentration von 0,1ml pro 100 mg Körpergewicht injiziert. In den Versuchen 2, 3 und 4 wurde eine Inhalationsnarkose mit einem Isofloran/Sauerstoffgemisch durchgeführt. Die Überwachung der Narkosetiefe erfolgte jeweils durch den Chirurgen mittels Kontrolle der Herz- und Atemfrequenz.

Nach Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe erfolgt in Rückenlage eine mediane Laparatomie und die Präparation des Ligamentum hepatoduodenale zur Darstellung der die Leber versorgenden Gefäße. Durch Setzen eines mikrovaskulären Clips auf das Ligamentum

---

hepatoduodenale wurde eine warme Leberischämie eingeleitet. Entsprechend der Versuchsgruppen wurde zuvor eine ischämische oder eine pharmakologische Präkonditionierung durchgeführt.

Im Falle einer Leberresektion wurden zusätzlich bei bestehender Ischämie die Haltebänder der Leber durchtrennt und eine 70%-ige bzw. 90%-ige Leberteilresektion nach der Methode von Higgins und Anderson [Higgins 1931] durch eine Ligatur mit Vicryl 3/0-Nahtmaterial nahe dem den entsprechenden Leberlappen versorgenden Gefäßstamm durchgeführt (Abbildung 2). Nach Reperfusion und Bluttrockenheit erfolgt der Bauchdeckenverschluß mit einer fortlaufenden Naht sowie die i.m. Injektion eines Analgetikums gegen postoperativen Schmerz. Postoperativ wurden alle Tiere mit ungehindertem Zugang zu Wasser und Futter ad libitum in Einzelkäfigen gehalten und täglich visitiert. Zusätzlich erhielten alle resezierten Tiere bis zum vierten postoperativen Tag Glukose 20% ad libitum über das Trinkwasser.

Abhängig von der Versuchsgruppe wurden die Tiere am Ende des Beobachtungszeitraums zur Blut und Gewebeentnahme in Narkose durch Ausbluten getötet. Aus der Vena cava inferior wurde Blut in ein 5 ml Serumröhrchen aufgezogen und sofort auf Eis gelagert. Anschließend wurde die Leber entnommen, gewogen und für weitere Gewebeuntersuchungen in flüssigem Stickstoff schockgefroren oder in Formalin konserviert.

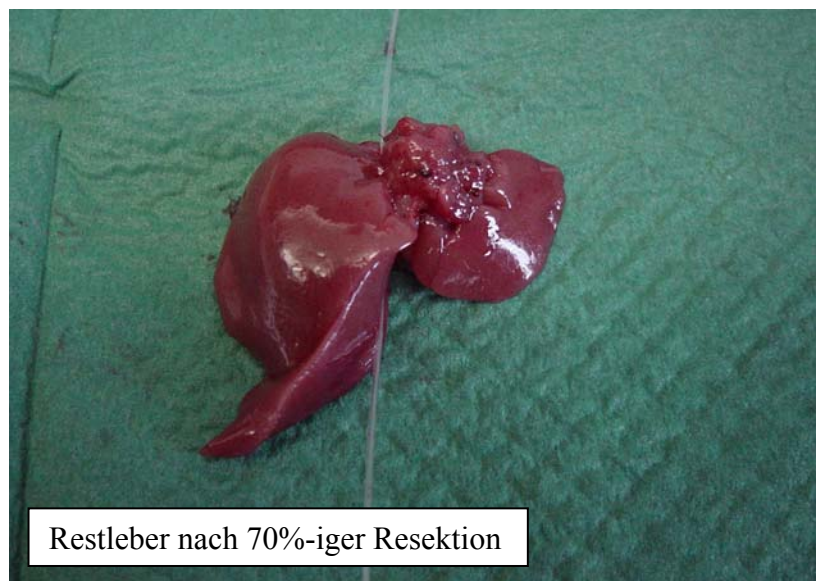
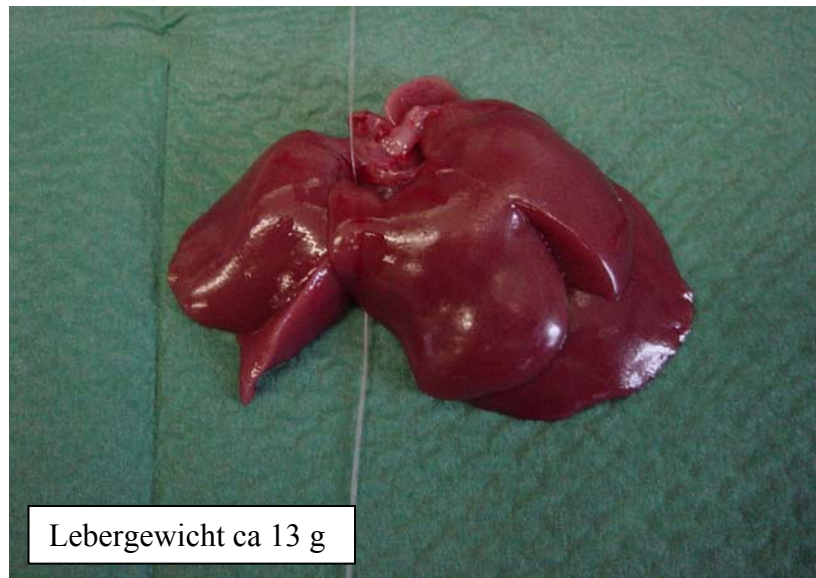


Abbildung 3: Parenchymmasse vor bzw. nach 70%-iger und 90%-iger Leberresektion einer 200-300 g schweren Wistar-Ratte (Verlauf der V. cava inferior - Plastikschauch)



#### 4. Analysen (Parameter und Analysetechniken)

##### 4.1 Serumparameter (Albumin, Bilirubin, AST, ALT, GLDH)

Im Serum der Versuchstiere wurden die Konzentrationen von Albumin und Bilirubin sowie der Enzyme AST, ALT und GLDH gemessen. Aufgrund des Verteilungsmusters innerhalb der Leberzelle (AST/ALT - Zytosol, GLDH - Mitochondrien) kann die Analyse dieser Parameter über die Schwere der zellulären IR Schädigung Auskunft geben. Desweiteren erlaubt die Analyse der Parameter Albumin und Bilirubin Rückschlüsse auf die Synthese- und Entgiftungsfunktion der Leber [Gressner 1989, Shaked 1997]. Hierzu wurden, bevor das Serum abpipettiert wurde, die in Serumröhrchen aufgenommenen Blutproben in einer vorgekühlten Zentrifuge mit 3000 x g für 10 min zentrifugiert. Die Untersuchungen wurden anschließend in der Abteilung Klinische Chemie der Charité, Humboldt-Universität Berlin, Campus Virchow-Klinikum mit handelsüblichen Reaktionskits durchgeführt.

##### 4.2 Histologische Färbung (Hepatozelluläre Schädigung, Mitose Index, Inflammatorisches Infiltrat)

Zur histomorphologischen Beurteilung wurde Lebergewebe mittels Hämatoxylin-Eosin- (HE-) Färbung aufgearbeitet. Diese Übersichtsfärbung wurde gewählt, da hiermit einerseits das Ausmaß der hepatozellulären Schädigung quantifiziert werden kann und andererseits sowohl die Anzahl der mitotischen Hepatozyten als auch die Intensität des inflammatorischen Infiltrates ausgezählt werden kann.

Bei der HE-Färbung entsteht durch Oxidation des Hämatoxylins der Farbstoff Hämatein, der mit Aluminiumionen einen positiv geladenen Komplex bildet. Dieser reagiert mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleinsäuren des Zellkerns, welcher dadurch im Präparat blau erscheint. Um das Zytoplasma anzufärben, wird das schwach saure Eosin verwendet, welches dieses rosa erscheinen läßt.

Materialien/Geräte:

Kryostat Microtom HM 500 OM	Microm-Laborgeräte, Walldorf, D
Objektträger SuperFrost	R.Langenbrinck, Emmendingen, D
Microtom	Leica Microsystem, Nussloch, D
Schüttler	Heidolph, Kelheim, D

Reagenzien:

Aceton	J.T.Baker, 8002, Deventer, NL
Hematoxylin	Sigma, HHS-32, Deisenhofen, D
Eosin, wässrig (0,3%)	Sigma, HT-110-2-80, Deisenhofen, D
Ethanol	Merck, Darmstadt, D
Essigsäure (99,8%)	Riedel de Haen, 33209, Seelze, D
Vitro-Clud	R.Langenbrinck, Emmendingen, D
Freezing Medium	Killik, 490110, Milano, Italien

Um das Ausmaß der hepatozellulären Schädigung histologisch zu quantifizieren, wurde bei der Auswertung der Schnitte ein histomorphologischer Score nach Bilbao angewandt [Bilbao 1999] (Tabelle 2). Es wurden jeweils 10 Gesichtsfelder pro Präparat analysiert. Die Analyse der in die Leber infiltrierten inflammatorischen Zellen erfolgte durch Zählung der polymorphkernigen Leukozyten, Monozyten und Lymphozyten in wenigstens 5 Gesichtsfeldern bei 400-facher Vergrößerung. Das leukozytäre Infiltrat wurde als absolute Anzahl der inflammatorischen Zellen pro Gesichtsfeld angegeben. Die Quantifizierung der mitotischen Zellen (Mitose Index) erfolgte durch Auszählung von insgesamt 2000 Hepatozyten und wurde als absolute Anzahl aller mitotischen Hepatozyten pro 2000 Zellen angegeben.

---

Grading zur Bestimmung des Zellschadens

---

Grad	Ausmaß des Zellschadens	histologische Kriterien
0	kein Zellschaden	klar abgrenzbare Zellgrenzen; runde, gleich-mäßige Kerne
1	leichter Zellschaden	leicht entrundete Kerne, Zellgrenzen erhalten
2	mäßiger Zellschaden	Verschwinden der Zell- und Kerngrenzen; Karyorrhexis, kondensiertes Chromatin; intra-zytoplasmatisch teils perinukleäre Vakuolenbildung, Chromatinverklumpung
3	starker Zellschaden	massivster Zellschaden mit allen genannten Morphologien, keine Zellgrenzen mehr erkennbar

---

Tabelle 2. Histologisches Grading [Bilbao 1999]

#### 4.3 Immunhistochemie (TUNEL, Ki67)

Immunhistochemische Färbungen ermöglichen die Analyse von apoptotischen (TUNEL Färbung) [Clavien 2000] und regenerativen (Ki-67 Färbung) Vorgängen [Gerlach 1997]. Die Immunhistochemie dient dem Nachweis antigener Zielstrukturen mittels Antigen-Antikörper-Reaktion und anschließender Sichtbarmachung durch Farbstoffreaktionen. Nach Anlagerung eines primären und eines biotinierten sekundären Antikörpers erfolgt eine Farbreaktion, die auf der Bindung von Biotin an Streptavidin, einem Protein aus dem Strahlenpilz *Streptomyces avidinii*, beruht. Ein löslicher Streptavidin-Peroxidase-Konjugat oxidiert letztendlich ein Chromogen, das in der oxidierten Form durch einen Farbumschlag sichtbar wird. Vereinfacht gesagt fungiert der biotinierte Sekundärantikörper als Bindeglied für die Reaktion des Chromogens, da sich zwischen Biotin und dem Streptavidin-Peroxidase-Komplex (Markermolekül) eine nahezu irreversible Bindung ausbildet. Ungebundene

Markermoleküle werden ausgewaschen, so daß nur gebundene eine positive (Farb-)Reaktion hervorrufen.

Materialien/Geräte:

Kryostat Microtom HM 500 OM	Microm-Laborgeräte, Walldorf, D
Objektträger	Langenbrinck, 041300, Emmendingen, D
Mikrotom	Leica Microsystem, Nussloch, D

Reagenzien:

Protein K Solution	30 µl
10x TdT Labeling Buffer	100 ml
10x TdT Stop Buffer	100 ml
TdT dNTP Mix	30 µl
TdT Enzyme	30 µl
Streptavidin-HRP	30 µl
DAB Solution	3,75 ml
Methyl Green Stain (0,1%)	50 ml
50x Co <sup>2+</sup>	30 µl
50x Mg <sup>2+</sup>	30 µl
50x Mn <sup>2+</sup>	30 µl
Cytonin	5 ml
TACS- Nuclease	15 µl
TACS- Nuclease Buffer	1,5 ml
Aceton	J.T.Baker, 8002, Deventer, NL
DAKO Pen	DAKO, S2002, Glostrup, Denmark
Biotin Blocking System	DAKO, X0590, Carpintiera, CA, USA
Peroxidase Blocking Reagent	DAKO, S2001, Carpintiera, CA, USA
Protein Block Serum-Free	DAKO, X909, Carpintiera, CA, USA

---

Liquid Dab + Substrate-Chromogen Solution	DAKO, K3467, Carpintiera, CA, USA
Peroxidase-Conjugated Streptavidin	DAKO, P0397, Carpintiera, CA, USA
Monoclonal Mouse Anti-Rat Ki-67 Antigen	DAKO, M7248, Carpintiera, CA, USA
Biotinylated Rabbit Anti-Mouse Immunglobulin	DAKO, E0464, Carpintiera, CA, USA

Die Beurteilung der Apoptose erfolgte mittels TUNEL Färbung, welche geeignet ist, um einerseits apoptotische Vorgänge nachzuweisen sowie andererseits diese durch Auszählen der apoptotischen Zellen zu quantifizieren [Clavien 2000]. Diese Färbung basiert auf der Identifizierung von apoptotischen Zellen durch farbliche Darstellung von DNA Fragmenten. Die Quantifizierung der Apoptose erfolgte durch Auszählung der angefärbten Zellen in 20 Gesichtsfeldern bei 400-facher Vergrößerung und wurde als Prozent der TUNEL-positiven Zellen pro Gesamtzellzahl angegeben.

Die Quantifizierung der Ki-67 positiven Zellen erfolgte durch Auszählung der angefärbten Zellen pro 1000 gezählter Hepatozyten in der Ki-67 Färbung bei 200-facher Vergrößerung und wurde als Prozent der Ki-67 positiven Zellen angegeben. Das Protein Ki-67 kann in allen Zellen nachgewiesen werden, die sich aktiv im proliferativen Zellzyklus befinden [Gerlach 1997].

#### 4.4 Myeloperoxidase (MPO)-Gewebskonzentration der Leber

Der MPO-Gehalt in der Rattenleber wurde zur Beurteilung der Intensität der postischämischen hepatischen Inflammation gemessen. MPO wird aus neutrophilen Granulozyten freigesetzt und kann somit als Parameter der neutrophilen Infiltration und Aktivierung im postischämischen Lebergewebe fungieren [Colletti 1996].

##### Reagenzien:

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck, 1.05104.1000, Darmstadt, D
K <sub>2</sub> EDTA	Fluka, 03662, Neu-Ulm, D

---

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Merck, 4873.1000, Darmstadt, D
Hexadecyltrimethylammoniumbromid (HTAB)	Sigma, H-9151, Deisenhofen, D
Tetramethylbenzidin (TMB)	Sigma, T-2885, Deisenhofen, D
DMSO	Fluka, 41640, Neu-Ulm, D
$\text{H}_2\text{O}_2$ (30% stabilisiert)	Merck, 822287, Hohenbrunn, D
$\text{H}_2\text{SO}_4$ 2N	Merck, 731.100150, Darmstadt, D
MPO (für Standards)	Sigma, M-6908, Deisenhofen, D

Zur Bestimmung des MPO-Gehaltes in der Leber wurden ca. 100 mg kryokonserviertes Gewebe in 0,05 M Kaliumdihydrogenphosphat (KDHP) Puffer und 0,5%-igem (w/v) Hexadecyltrimethylammoniumbromid (HTAB) mit Hilfe eines Ultraturrax dismembriert. Die Proben wurden anschließend auf Eis gelagert. Das Detergenz HTAB setzt aus den primären Granula der Neutrophilen Granulozyten MPO frei. Nach Zentrifugation der Proben mit 2000 x g bei 4°C wurden jeweils 1 ml der Überstände für 2 Stunden bei 60°C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation mit 15000 x g für 2 Minuten wurden 25 µl der abgekühlten Probe in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Zu den Proben wurden 25 µl eines Tetramethylbenzidin-Dimethyl-Sulfoximin-(DMSO) Gemisches (0,1% w/v) und 200 µl eines  $\text{H}_2\text{O}_2$ /KDHP Gemisches (1:18000) in die Mikrotiterplatte gegeben. Nach 5 Minuten Inkubationszeit bei 37°C wurden 50 µl einer 2 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -Lösung dazu gegeben, um die kinetische Reaktion zu unterbrechen. Die Messung der Extinktion erfolgte bei 450 nm im Fluostar. Die Berechnung der MPO-Konzentrationen erfolgte über eine Standardkurve, die anhand von MPO-Standards der Konzentrationen von 15,7 mU/ml bis 1000 mU/ml erstellt wurde.

#### 4.5 Hepatische Mikrozirkulation (Intravitalmikroskopie, Laserdopplerflowmetrie)

Mittels der Intravitalmikroskopie wurden die Mikroperfusion in der Rattenleber gemessen. Hierbei wurde das Ausmaß der postischämischen Mikrozirkulationsstörung und die Intensität der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion analysiert [Menger 1999]. Die Durchführung der IVM-Untersuchungen erfolgte im Institut für Experimentelle Chirurgie (Leiter: Prof. Dr. med. M. Menger) an der Universität Homburg/Saar sowie der Abteilung für Experimentelle Chirurgie (Leiterin: Prof. Dr. med. B. Vollmar) an der Universität Rostock.

##### Materialien/Geräte:

Zeiss Axio-Tech Mikroskopie	Zeiss, Oberkochen, D
FK 6990 Videokamera	Prospective Measurements Inc., USA
Video System VO-5800 PS	Sony, München, D
Cliniflow II Model FM 701D	Carolina Medical Electronics, USA
Flußmeßköpfe SF105 und SF 107,5	Carolina Medical Electronics, USA

##### Reagenzien:

Natrium Fluoreszein	Merck, Darmstadt, D
Rhodamin-6G	Merck, 1.07599.0100, Darmstadt, D

Die IVM wurde in einer „epi-illumination“ Technik durchgeführt, nachdem das Versuchstier in Linksseitenlage gelagert wurde. Die Aufnahmen wurden auf Video aufgenommen und nach Digitalisierung mit dem Capimage-Programm ausgewertet. Zum Erhalt eines Hintergrundbildes wurde dem Versuchstier 2 µmol/kgKG Natrium-Fluoreszein intravenös injiziert. Die sinusoidale Perfusion wurde quantifiziert durch die Bestimmung der Anzahl der perfundierten Sinusoide in 10 repräsentativen Acini und als durchschnittliche prozentuale sinusoidale Perfusion angegeben.

Während der IVM wurden die Leukozyten in vivo mit Rhodamin-6G (0,1 µmol/kg i.v.) gefärbt und entsprechend ihrer Interaktion mit der sinusoidalen oder postsinusoidalen

Gefäßwand analysiert. Die stagnierenden sinusoidalen Leukozyten sind definiert, als jene an der Gefäßwand anhaftende Leukozyten im midzonalen Segment für länger als 20 Sekunden. Analysiert wurden 10-15 randomisiert ausgewählte Acini pro Tier, angegeben als n Zellen pro mm<sup>2</sup>. Die Einteilung der Leukozyten in den postsinusoidalen Venolen erfolgte nach dem folgenden Prinzip. Jene Leukozyten, welche länger als 20 Sekunden Kontakt mit der Gefäßwand hatten, wurden als stagnierende Leukozyten definiert. Es wurde eine Gefäßlänge von 100 µm für die Untersuchung beobachtet. Die stagnierenden Leukozyten, die sogenannten „Stickers“, wurden als n Zellen pro mm<sup>2</sup> angegeben. Jene Leukozyten, die weniger als 20 Sekunden Kontakt mit der Gefäßwand hatten, wurden als temporäre stagnierende Leukozyten, sogenannte „Rollers“, definiert. Angegeben wurden die „Rollers“ in % zur Gesamtzahl der die Venolen durchfließenden Leukozyten, wobei als Grundlage die Auszählung der passagierten Leukozyten innerhalb von 20 Sekunden über ein Gefäßabschnitt von 100 µm war. Es wurden jeweils 5-10 Venolen pro Tier analysiert [Vollmar 1994]. Darüber hinaus erfolgte bei der Intravitalmikroskopie die Messung der NADH Fluoreszenz der Leberoberfläche, die einen Indikator für die mitochondriale Funktion darstellt [Vollmar 1997]. Die Messung der erythrozytären Flußrate (velocity) bzw. der erythrozytären Flußrate (velocity) bezogen auf den Gefäßdurchmesser (volumetric blood flow) erfolgte in 5 postsinusoidalen Venuolen und in 8-10 individuellen Sinusoiden der midzonalen Region [Richter 2001].

Die Laserdopplerflowmetrie zur Messung der Blutflußgeschwindigkeit in der V. portae erfolgte nach dem elektromagnetischen Prinzip mit dem Cliniflow® II Model FM 701D und den Flußmeßköpfen SF105 (5 mm) und SF 107,5 (7,5 mm). Die Flußköpfe wurden intraoperativ direkt um die V. portae plziert, und es wurde vor Induktion der Ischämie, sowie 1, 3, 5 und 10 min nach Reperfusion die portalvenöse Flußgeschwindigkeit gemessen.



#### 4.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in der Leber erfolgte mittels eines photometrischen Nachweises nach Lowry [Lowry 1951]. Dazu wurden die Gewebeprobe(n) zunächst homogenisiert, mit Wasser und Aceton gewaschen und danach mit Natronlauge, Bicinochinnic-Acid-Lösung und 4%-iger Kupfersulfatlösung versetzt. Danach erfolgte die photometrische Bestimmung der Lichtabsorption bei 562 nm, die proportional zum Proteingehalt der Probe ist. Mit Hilfe einer Standardkurve konnte dann die Proteinkonzentration der Probe bestimmt werden.

#### 4.7 Western Blot (Caspase 3)

Die Analyse von Proteinen aus dem Lebergewebe erfolgte mit der Methode des Western Blot. Zur Beurteilung der Apoptose wurden mit der Caspase 3 ein wichtiges Protein der apoptotischen Kaskade untersucht [Slee 1999, Jaeschke 2003].

##### Materialien/Geräte:

Blockthermostat BT100	Kleinfeld-Labortechnik, Gehrden, D
Mini Protean 3 Electrophoresis-Cell-Set	Bio-Rad, 165-3301, München, D
Mini Trans-Blot Cell-Set	Bio-Rad, 170-3930, München, D
Nitrocellulose-Membran	Bio-Rad, 162-0112, München, D
Gel-Blotting-Papier	Schleicher&Schuell, 10426694, Dassel, D
Kodak Film	Kodak, 636 03 5, Rochester, NY, USA

##### Reagenzien:

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Merck, 1.06345.1000, Darmstadt, D
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Merck, 1.06580.1000, Darmstadt, D
Glycin	Serva, 23390, Heidelberg, D
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Merck, 8.17034.1000, Hohenbrunn, D
Tris Base	Sigma, T-1503, Steinheim, D

---

Tris HCl	Sigma, T-3253, Steinheim, D
Acrylamid 30%	Roth, 3029.1, Karlsruhe, D
6-Aminohexansäure	Merck, 8.00145.0250, Hohenbrunn, D
Ammonium Persulfat	Sigma, A-9164, Steinheim, D
Methanol	J.T.Baker, 8045, Deventer, NL
Tetramethylethylenediamine	Sigma, T-9281, Steinheim, D
Tween20	Aldrich, 27.434-8, Steinheim, D
$\beta$ -Mercaptoethanol	Calbiochem, 444203, Darmstadt, D
Bromphenol Blue	Sigma, B-6896, St.Louis, MO, USA
Glycerol	Sigma, G-7757, Steinheim, D
DTT	Sigma, D-0623, Deisenhofen, D
TES	Sigma, T-0772, St.Louis, MO, USA
Blot-Quick-Blocker (Milchpulver)	Chemicon, 2078E, Temecula, CA, USA
ECL Western blotting detection reagents	Amersham, RPN2106, Freiburg, D
Rainbow protein molecular weight marker	Amersham, RPN756, Freiburg, D
Primäre Antikörper: Caspase 3	BD, 611048, Heidelberg, D
Sekundäre Antikörper: Anti mouse IgG	Amersham, 164015, Freiburg, D

Das Prinzip der Western Blot Analyse beruht auf der gelelektrophoretischen Auftrennung von Proteinen aus dem verdünnten Leberhomogenisat mittels SDS/Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE). Hierbei wandern die Proteine entsprechend ihrer Größe durch eine Gelmatrix und werden anschließend auf eine Nitrocellulose-Membran mittels Wet-Transfer-Methode geblottet. Durch Inkubation der Membran mit einem Primärantikörper und der Behandlung mit dem entsprechenden sekundären Antikörper kann mittels Chemiluminescence-Reaktion die spezifische Proteinbande sichtbar gemacht werden.

Prinzipiell reagiert hierbei der spezifische Primärantikörper mit dem zu untersuchenden Protein, welches an der Nitrocellulose-Membran gebunden ist, während der sekundäre Antikörper wiederum mit dem Fc-Fragment des primären Antikörpers reagiert. Da der Sekundärantikörper mit einer Peroxidase modifiziert ist (peroxidase-labeled), oxidiert dieser das in der ECL-Detection-Reagenz enthaltene Luminol. Dies führt sodann zu einer Lichtemission mit einer maximalen Wellenlänge von 428 nm, welche in einer Dunkelkammer mit Hilfe von Entwicklergerät und Film die spezifischen Banden sichtbar werden läßt [Luss 1994].

#### 4.8 Reverse Transkriptase-Polymerase Ketten Reaktion (ICAM-1, Cytochrom C)

Mittels Reverse Transkriptase-Polymerase Ketten Reaktion (reverse transkriptase-polymerase chain reaktion; rt-PCR) wurde das Adhäsionsmolekül ICAM-1 nachgewiesen. Dies ist maßgeblich an der Leukozyten/Endothel-Interaktion im Rahmen der hepatischen IR Schädigung beteiligt [Yadav 1998, Menger 1999, Martinez-Mier 2000]. ICAM-1 wird auf der Oberfläche der Endothelzellen der Leber exprimiert. Es unterstützt die Anheftung von Leukozyten am Endothel und unterstützt folglich die konsekutive Transmigration von Leukozyten in das Interstitium [Jaeschke 1997, Kubes 1999].

Desweiteren wurde Cytochrom C als Parameter der apoptotischen Aktivität analysiert [Jaeschke 2003]. Cytochrom C ist essentieller Bestandteil der mitochondrialen Atmungskette und ist an der Induktion der Apoptose sowie an der Aktivierung der Caspasenkaskade beteiligt. Der Austritt von Cytochrom C aus den Mitochondrien in das Zytosol markiert durch Aktivierung der Caspase 9 den Beginn apoptotischer Vorgänge in der Zelle [Slee 1999].

#### Materialien/Geräte:

Ultraturrax	IKA, 2953000, Staufen, D
Zentrifuge	Haraeus, Hanau, D
Photometer	Amersham, GeneQuant 2, Freiburg, D

---

Küvette	Hellma, 105.202.008-QS, Mühlheim, D
Thermocycler	MJ Research, PTC-200, Waltham, USA
Power Pac 200	Biorad, 165-5053, München, D
UV Messgerät	Biometra TI3/Biodoc2, Göttingen, D
<u>Reagenzien:</u>	
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma, D-5758, Deisenhofen, D
Guanidiniumthiocyanat	Sigma, G-7028, Deisenhofen, D
Ethanol	Merck, 1.00986, Darmstadt, D
Natriumcitrat	Merck, 6586, Darmstadt, D
N-Lauryl-Sarcosin	Sigma, L-9150, Deisenhofen, D
β-Mercaptoethanol	Sigma, M-6250, Deisenhofen, D
Natriumacetat	Sigma, S-2889, Deisenhofen, D
Isopropanol	Sigma, 405-7, Deisenhofen, D
Phenol	Sigma, P-4682, Deisenhofen, D
Oligo(dt) 12-18	Gibco, 18418-012, Karlsruhe, D
Rnasin	Promega, N2111, Mannheim, D
10x PCR-Puffer	Gibco, Y02028, Karlsruhe, D
MgCl <sub>2</sub>	Gibco, Y02016, Karlsruhe, D
DNTP	Gibco, 10297018, Karlsruhe, D
DEPC	Sigma, D-5758, Deisenhofen, D
DTT	Gibco, Y0014, Karlsruhe, D
Super Script 2	Gibco, 10297018, Karlsruhe, D
Taq Polymerase	Gibco, 10342-020, Karlsruhe, D
Primer	Fa. Interactiva, Ulm, D
Basenpaarleiter	Amersham 50, 27-4005, Freiburg, D
Agarose	Roth, 2267.4, Karlsruhe, D

---

Ethidiumbromid	Sigma, E-8751, Deisenhofen, D
Xylencyano	Sigma, X-4126, Deisenhofen, D
Bromphenolblau	Sigma, B-6896, Deisenhofen, D
Glycerol	Sigma, G-5516, Deisenhofen, D
Tris HCL	Sigma, T-3253, Deisenhofen, D
Borsäure	Sigma, E-5134, Deisenhofen, D

Für die Analyse der mRNA wurde das Gewebe zunächst nach der Methode von Chomczynski isoliert und mittels Reverse Transkriptase-Reaktion in cDNA umgeschrieben [Chomczynski 1987]. Die Proben wurden dann mittels spezifischem Primer durch Polymerase-Ketten-Reaktion amplifiziert und auf Agarosegel aufgetragen. Für die Amplifizierung der cDNA wurden spezifische Primer und Versuchsbedingungen angewendet. Zur Beurteilung der PCR wurde als interner Standard  $\beta$ -Actin mitgeführt, um den Einsatz gleichmäßiger DNA Mengen in den untersuchten Proben zu kontrollieren.

#### *$\beta$ -ACTIN* [Nudel 1983]

Primer: Antisense 5' ACC CAC ACT GTG CCC ATC TA'3

Sense 5' CGG AAC CGC TCA TTG CC '3

#### *Cytochrom C* [Scarpulla 1981]

Primer: Antisense 5' GTT CTT GTT GGC ATC TGT G'3

Sense 5' GGA CGT CTC CCT AAG AGT C '3

#### *ICAM-1* [Kita 1992]

Primer: Antisense 5' ACC ACT GCC TGG CGG CTC'3

Sense 5' ATG GCT TCA ACC CGT GCC'3

#### 4.9 Electrophoric Mobility Shift Assay (NF<sub>κ</sub>B)

Mittels Electrophoric Mobility Shift Assay (EMSA) wurde die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF<sub>κ</sub>B untersucht. Durch NF<sub>κ</sub>B wird die Expression von Proteinen reguliert, die wesentlich an Vorgängen wie Inflammation, Apoptose, Zellreplikation und Zell/Endothelzell-Interaktion beteiligt sind [Barnes 1998, Serracino-Inglott 2001]. Die Analyse erfolgte in Zusammenarbeit mit der Universität Ulm, Abteilung Innere Medizin 1.

##### Materialien/ Reagenzien:

Plastikfolie	Amersham, 80-1129-37, Freiburg, D
Säule	Amersham, 17-0855-02, Freiburg, D
Radiofilm	Biomax Film, Kodak, Rochester, USA
Acrylamid	Roth, 3030.1, Karlsruhe, D
APS	Sigma, A9164, Deisenhofen, D
Temed	Sigma, T9281, Deisenhofen, D
dNTP Set (dGTP, dCTP, dTTP)	Gibco, BRL 10297-018, Karlsruhe, D
Alpha-dATP	Amersham PB 10204-9,25, Freiburg, D
Klenowenzym	Biolaps 210s 200 units, USA
Tris USB	Amersham, 13735, Freiburg, D
EDTA (Titriplex2)	Roth, 8043.1, Karlsruhe, D
DTT	Sigma, D0632, Deisenhofen, D
Glycerol	Sigma, G9012, Deisenhofen, D
Natriumfluorid 5 µl/ml	Sigma, S7920, Deisenhofen, D
PMSF 5 µl/ml	Sigma, P7626, Deisenhofen, D
Leupeptin 1 µl/ml	Sigma, L2884, Deisenhofen, D
Pepstatin 2,5 µl/ml	Sigma, P4265, Deisenhofen, D
DTT 0,5 µl/ml	Sigma, D0632, Deisenhofen, D
Aprotinin 10 mg/ml	Sigma, A4529, Deisenhofen, D

### Kernextraktion

Zur Aufbereitung der Kernproteine wurden 500 mg Leber in Sucrose-Homogenisationspuffer bei 4°C homogenisiert. Es folgte eine Auftrennung des Homogenisats durch Zentrifugieren bei 100.000 g für 3,5 h. Die extrahierten Kernproteine wurden zweifach mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend inkubierten die Kerne in Hochsalzpuffer für 50 min bei 4°C, um die Kernmembran osmotisch zu zerstören. Danach wurde das Homogenisat erneut zentrifugiert, die Kernproteine aus dem Überstand genommen und aliquotiert [Steinle 1999].

### Shift

Für das Auftragen der Proben in die Geltaschen wurde zunächst ein Mix aus Bindungspuffer und Dide hergestellt. Danach erfolgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Anschließend wurden die verdünnten Proben in die Geltaschen pipettiert, die Gelkammer mit TGE-Puffer versetzt und mit einer Spannung von 150 V laufen gelassen. Um den Lauf der Proben verfolgen zu können, wurde eine freie Geltasche mit 20 µl Ladepuffer (Farbstoff) gefüllt. Aufgrund des veränderten Laufverhaltens der DNA- gebundenen Proteinfraktion von NF<sub>κ</sub>B konnte diese von der ungebundenen Proteinfraktion abgegrenzt werden [Schmid 1994].

### Supershift

Durch den Supershift wurden mit Hilfe von Antikörpern die Untereinheiten von NF<sub>κ</sub>B dargestellt. Zu diesen zählen Proteine der NF<sub>κ</sub>B / Rel- Proteinfamilie wie Rel A (p65), Rel B, c-Rel, NF<sub>κ</sub>B (p105/p50) und NF<sub>κ</sub>B (p100/p52). Die einzelnen Komplexe unterscheiden sich durch ihr Molekulargewicht und wurden anhand des Laufverhaltens in der Elektrophorese dargestellt [Schmid 1994].

### Competition

Bei der Competition handelt es sich um den Nachweis für die spezifische Bindung von NF $\kappa$ B. Diese Spezifität wird nachgewiesen, indem man einen Teil radioaktiv markierter DNA sowie einen Teil unmarkierter DNA in den Versuchsansatz gibt. Bei zunehmender Konzentration von unmarkierter DNA und abnehmender Signalintensität wird der Beweis der spezifischen Bindung erbracht.

### **4.10 Statistik**

Zur Auswertung der Daten wurde aus allen Datensätzen der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwerts (SEM) berechnet. Diese Berechnung erfolgte mit dem Datenverarbeitungsprogramm Microsoft Excel 97. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mittels Box-and-Whisker-Plots bzw. mittels Säulen- oder Liniendiagramm.

Alle statistischen Tests wurden mit dem statistischen Auswertungsprogramm SPSS, Version 10.0 gerechnet. Nach vorheriger Prüfung der Datensätze auf Normalverteilung wurden der student's t-test oder die einfache Varianzanalyse mit Meßwiederholung für normalverteilte Datensätze angewandt, um zwischen zwei oder mehreren Gruppen zu vergleichen. Korrelationen wurden mit dem bivariaten Korrelationstest (Spearman's correlation coefficient) analysiert. Die Berechnung der Überlebenskurven erfolgte mit dem log rank test. Ein Ergebnis galt als statistisch signifikant, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,05$  war.



## **D. Ergebnisse**

### **1. Projekt 1 – IP-Zeitprotokoll**

#### **1.1. Hepatozellulärer IR Schaden (Serumkonzentrationen AST, ALT, GLDH)**

Alle Gruppen zeigten im Vergleich zur sham operierten Gruppe (AST  $29 \pm 2$  U/l, ALT  $26 \pm 4$  U/l, GLDH  $3,6 \pm 0,5$  U/l) jeweils erhöhte Serumwerte für AST, ALT und GLDH. Die höchsten Serumkonzentrationen wurden in der unbehandelten Ischämiegruppe gemessen. Die Konzentrationen betrugen hier für die AST  $399 \pm 63$  U/l, für die ALT  $249 \pm 118$  U/l und für die GLDH  $192 \pm 63$  U/l.

Durch IP-Vorbehandlung mit 5/30, 5/45 und 15/30 min konnte jeweils eine statistisch signifikante Abnahme der Serumkonzentrationen erzielt werden (jeweils  $p=0,0001$ ), wohingegen die IP-Zeitintervalle 5/5, 5/10 und 5/15 min keine statistisch signifikante Abnahme im Vergleich zur unbehandelten Ischämiegruppe aufwiesen. Nach IP-Vorbehandlung mit 10/10 min war die AST mit  $259 \pm 39$  U/l ( $p<0,05$ ) und die GLDH mit  $108 \pm 40$  U/l ( $p<0,05$ ) jeweils signifikant verringert, die Analyse der ALT Serumkonzentrationen zeigte jedoch keinen statistisch signifikanten Unterschied zur unbehandelten Ischämiegruppe (Abbildung 4 A-C).

Basierend auf diesen Daten wurde für die folgenden Versuchsreihen das Zeitintervall 5/30 min als optimales IP-Zeitprotokoll aus drei Gründen gewählt. Zum einen genügten 5 min Ischämie, um einen signifikanten Leberzellschaden zu induzieren. Zum zweiten beobachteten wir, daß mit zunehmender Reperfusionsphase die Schädigungsparameter umso geringer ausfielen. Drittens, die Verlängerung der Reperfusionsdauer von 5/30 auf 5/45 min erbrachte keine weitere signifikante Senkung der Schädigungsparameter, sondern bedeutete lediglich eine Verlängerung der totalen Operationszeit.

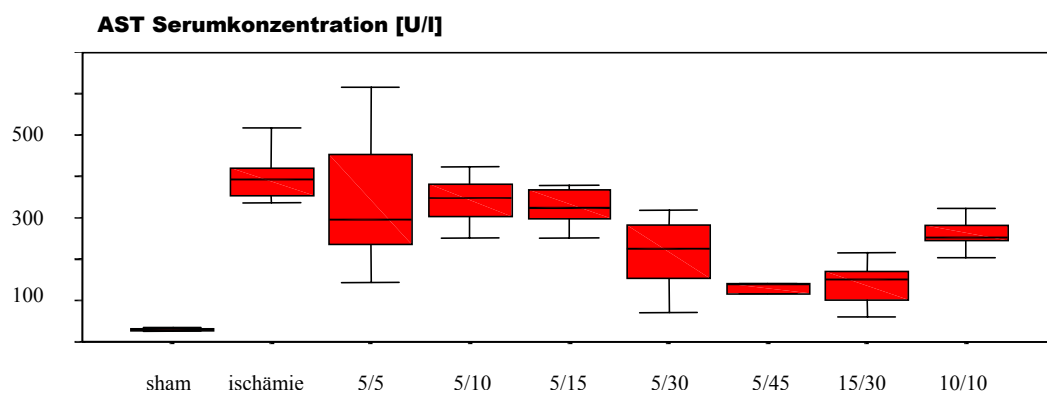
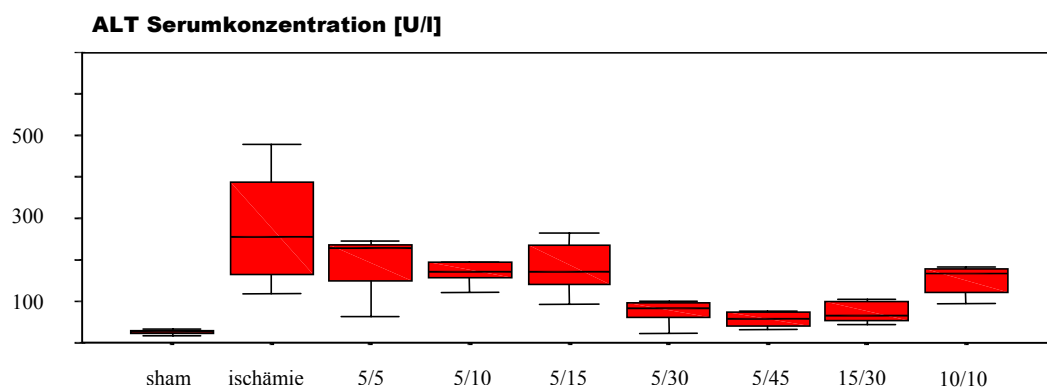
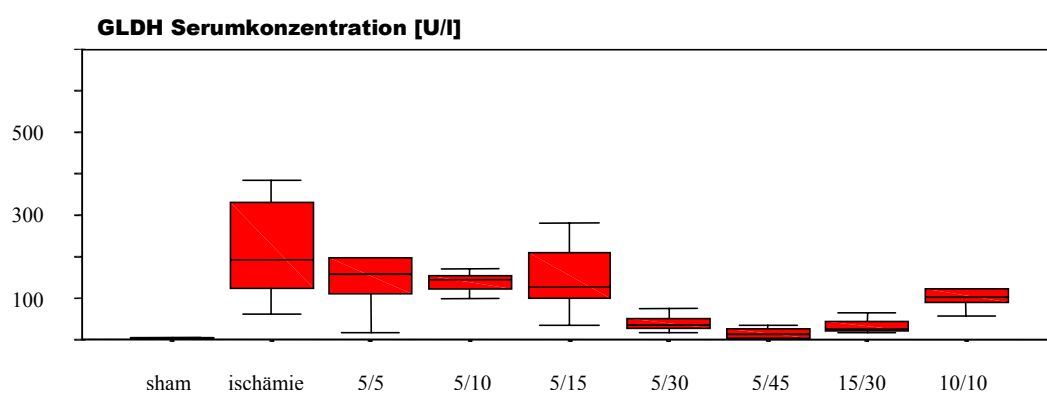
**A****B****C**

Abbildung 4: Serumkonzentrationen von AST (A), ALT (B) und GLDH (C) in U/l 24 h nach 45-minütiger warmer Leberischämie bei sham operierten Tieren, unbehandelten Ischämietieren und mit verschiedenen IP-Zeitintervallen vorbehandelten Tieren (Box-and-Whisker-Plots)

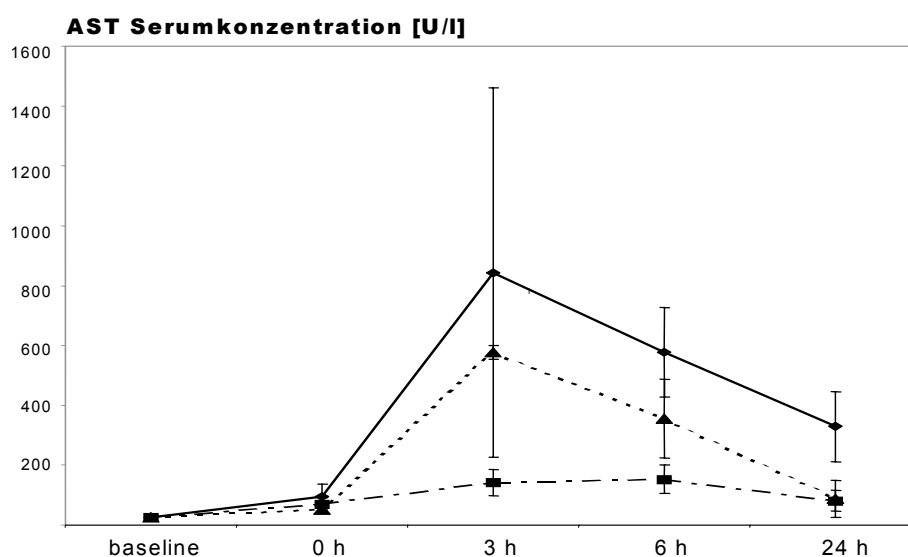
## 1.2. Zusammenfassung Projekt 1

- Signifikante Reduktion der Serumkonzentrationen leberspezifischer Enzyme durch IP-Behandlung für die IP-Zeitintervalle 5/30, 5/45, 15/30 und partiell 10/10 min, jedoch nicht für die IP-Zeitintervalle 5/5, 5/10 und 5/15 min.
- 5 min Ischämie im Rahmen der IP-Behandlung waren ausreichend, um einen signifikanten Leberzellschaden zu induzieren.
- Je länger die Reperfusionsphase im Rahmen der IP-Behandlung andauerte, desto geringer waren die Schädigungsparameter.
- Zeitintervall 5/30 min als optimales IP-Zeitprotokoll

## 2. Projekt 2 – warme Leberischämie

### 2.1. Hepatozellulärer IR Schaden (Serumkonzentrationen AST, ALT, GLDH, HE-Färbung)

Die hepatozelluläre IR Schädigung war gemessen an den Serumkonzentrationen von AST, ALT und GLDH signifikant geringer nach MP- und IP-Behandlung als in den unbehandelten Kontrollen. Wie in den Graphiken ersichtlich wird, war insbesondere zu den Zeitpunkten 3 h, 6 h und 24 h nach Reperfusion die postischämische Ausschüttung von AST und ALT reduziert (Abbildung 5). Die mitochondriale Schädigung fiel nach 6 h und 24 h nach Reperfusion signifikant geringer in beiden Behandlungsgruppen aus verglichen mit der unbehandelten Kontrolle (Abbildung 5). Interessanterweise waren die Serumkonzentrationen bei IP-behandelten Tieren insgesamt niedriger als bei MP-behandelten Tieren, ohne jedoch Signifikanzniveau zu erreichen.



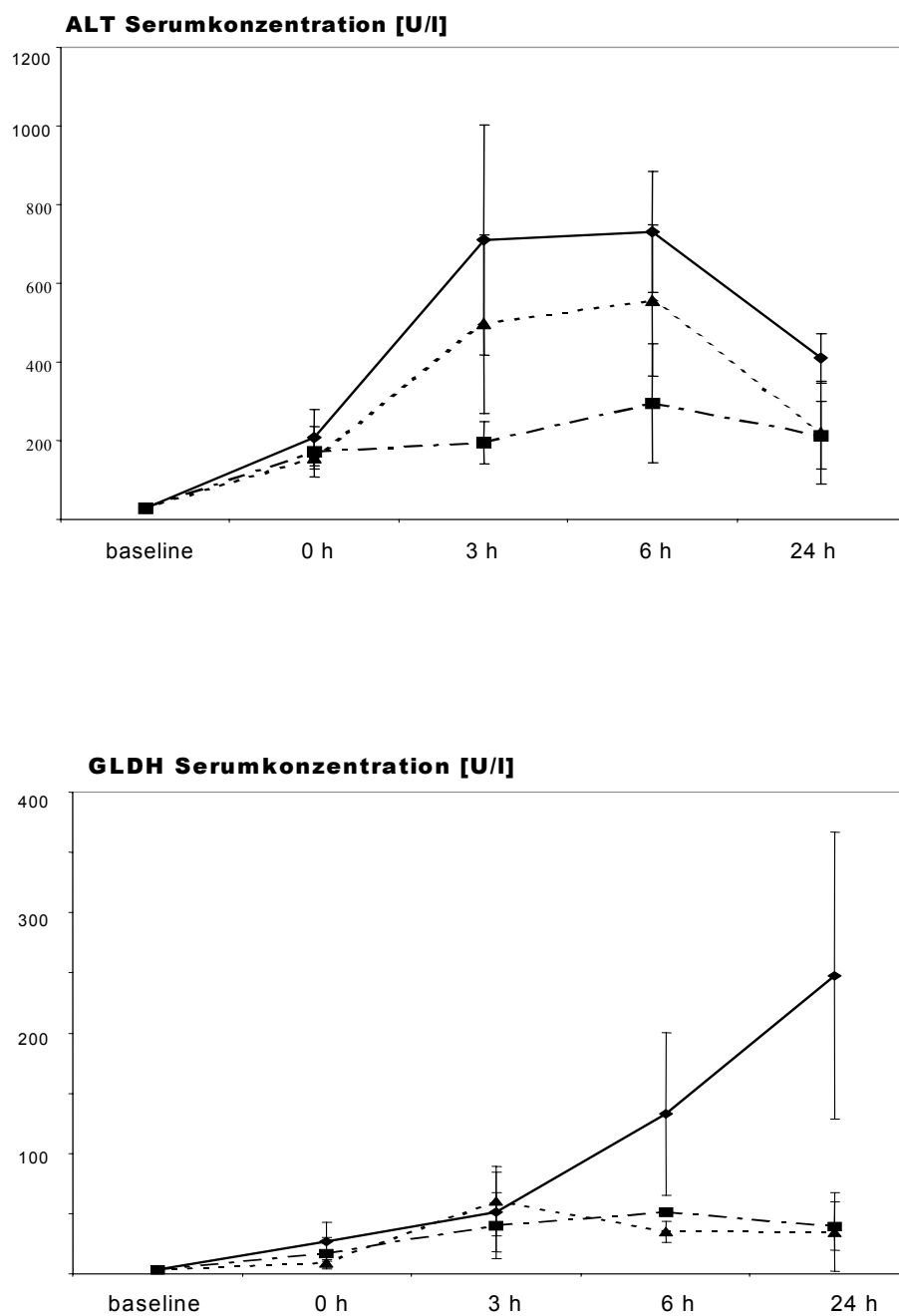


Abbildung 5: Serumkonzentrationen von AST, ALT und GLDH nach 45-minütiger warmer Leberischämie (—◆— Ischämie; -■- I/P-Behandlung; ....▲.... MP-Behandlung)

Analog zu den Enzymkonzentrationen von AST, ALT und GLDH fiel die histomorphologische Schädigung des Leberparenchyms bei IP- und MP-behandelten Tieren geringer aus als in den unbehandelten, ischämischen Kontrollen (Abbildung 6). Ein statistisch signifikanter Unterschied bestand bei 6 h nach Reperfusion für beide Behandlungsgruppen

verglichen mit der Kontrollgruppe sowie unmittelbar (0 h) nach Reperfusion für die MP-Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe. Statistische Unterschiede zwischen der IP- und MP-Gruppe bestanden nicht (Tabelle 1).

Hepatoz. Schädigung	Kontrolle	IP-Behandlung	MP-Behandlung
baseline	0	0	0
0 h	$1.6 \pm 0.4$ *	$1.1 \pm 0.3$	$0.7 \pm 0.1$
3 h	$1.4 \pm 0.4$	$1.1 \pm 0.2$	$1.15 \pm 0.2$
6 h	$1.85 \pm 0.2$ +	$1.3 \pm 0.3$	$1 \pm 0.4$
24 h	$2 \pm 0.2$	$2.2 \pm 0.3$	$2.8 \pm 0.3$

Tabelle 1: Hepatozelluläre Schädigung nach einem histomorphologischen Score nach Bilbao [Bilbao 1999]. Angegeben sind Mittelwert  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$  für Kontrolle versus MP; +  $p < 0,01$  für Kontrolle versus IP und MP

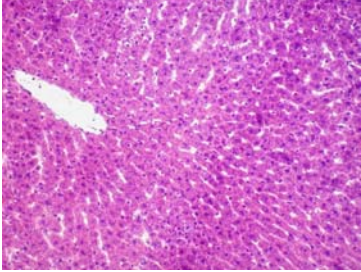
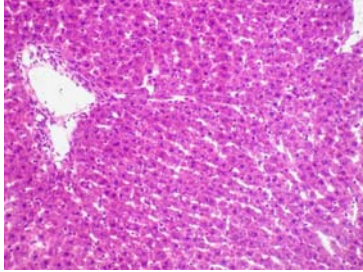
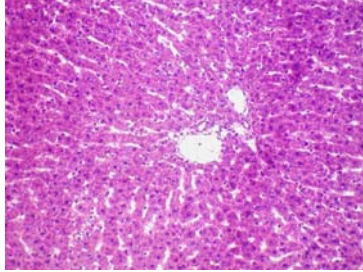
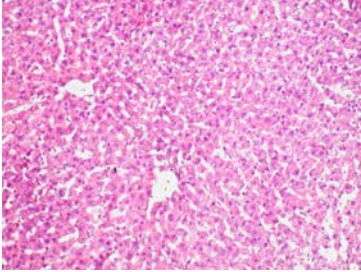
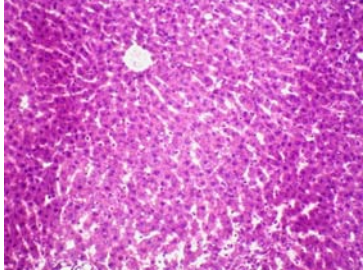
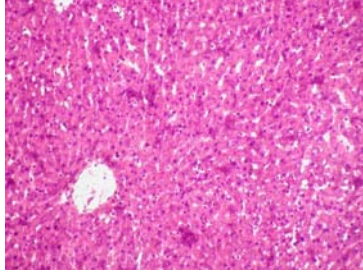
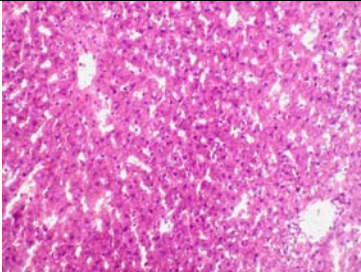
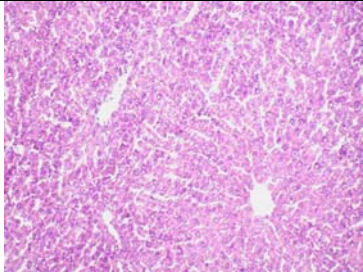
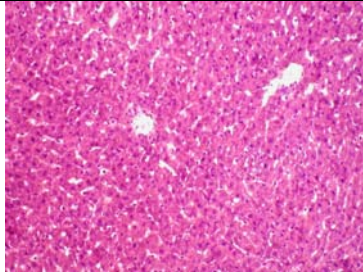
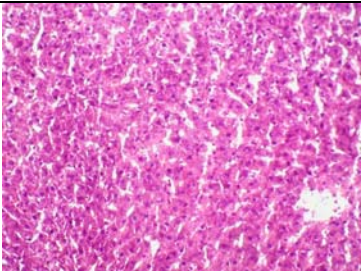
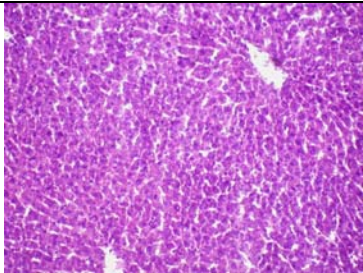
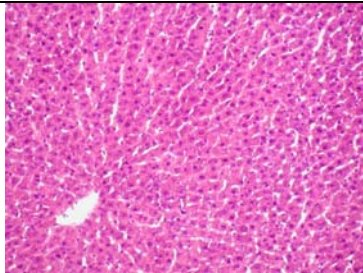
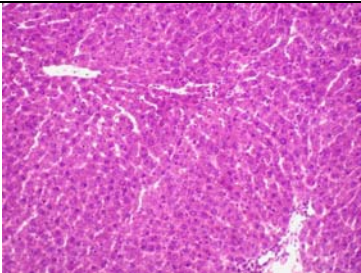
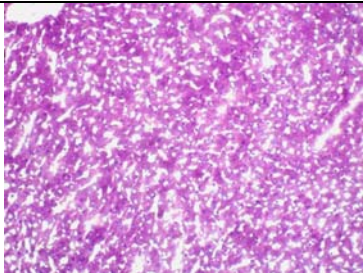
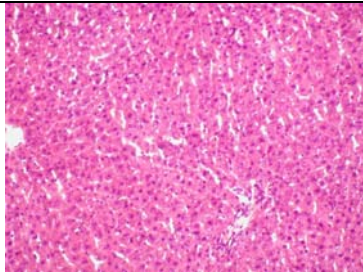
	Kontrolle	IP-Behandlung	MP-Behandlung
vor Ischämie			
0 h			
3 h			
6 h			
24 h			

Abbildung 6: Hepatozelluläre IR Schädigung (HE-Färbung 400-fach)

## 2.2 Apoptose (Cytochrom C mRNA, Caspase 3 Protein, TUNEL Färbung)

Die Analyse der Apoptose-Parameter zeigte eine signifikant geringere postischämische apoptotische Aktivität in den Lebern von MP-behandelten Tieren, wohingegen IP-behandelte und unbehandelte Tiere keinerlei Unterschiede aufwiesen.

Die Expression von Cytochrom C mRNA und von Caspase 3 war in der MP-Gruppe zu den Zeitpunkten 0 h und 3 h, sowie für Cytochrom C mRNA auch nach 6 h, deutlich vermindert gegenüber IP-behandelten und unbehandelten Kontrolltieren. Während in unbehandelten Ischämietieren die mRNA Expression unmittelbar (0 h) nach Reperfusion deutlich reduziert war und erst nach 6 h einen Anstieg der mRNA Expression aufwies, war in IP-behandelten Tieren zu allen Meßzeitpunkten eine ausgeprägte mRNA Expression nachweisbar. Bei MP-behandelten Tieren beobachteten wir erst 24 h nach Reperfusion einen Anstieg der mRNA Expression (Abbildung 7).

Analog hierzu gelang der Proteinnachweis von Caspase 3 in unbehandelten Ischämietieren und IP-behandelten Tieren gleichermaßen zu allen Zeitpunkten, wohingegen in der MP-Gruppe zum Zeitpunkt 0 h und 3 h nach Reperfusion deutlich weniger Protein nachweisbar war (Abbildung 8).

Die Anzahl der TUNEL positiven Zellen war signifikant reduziert in IP- und MP-behandelten Tieren 3 h, 6 h und 24 h nach Reperfusion. Ein Unterschied zwischen MP- und IP-behandelten Tieren war, im Gegensatz zu den mRNA und Proteinanalysen von Cytochrom C und Caspase 3, jedoch nicht vorhanden. In allen Behandlungsgruppen zeigte sich eine zunehmende Apoptoseaktivität im Verlauf des Beobachtungsintervalls nach Reperfusion (Tabelle 2).



TUNEL pos. Zellen	Kontrolle	IP-Behandlung	MP-Behandlung
baseline	$0.5 \pm 0.3$	$1.8 \pm 0.6$	$0.3 \pm 0.2$
0 h	$2.8 \pm 0.6$	$6.5 \pm 0.9$	$1.3 \pm 0.9$
3 h	$36.3 \pm 9.1 \#$	$7.9 \pm 1.4$	$6 \pm 1.4$
6 h	$38.2 \pm 10.5 *$	$17.2 \pm 4.5$	$8.5 \pm 0.8$
24 h	$65.3 \pm 6.3 +$	$22.4 \pm 6.8$	$10.2 \pm 0.6$

Tabelle 2: TUNEL positive Zellen [%]. Angegeben sind Mittelwert  $\pm$  SEM. #  $p < 0,05$  für Kontrolle versus IP und MP; \*  $p < 0,05$  für Kontrolle versus MP; +  $p < 0,01$  für Kontrolle versus IP und MP

#### Cytochrom C (36 KD)

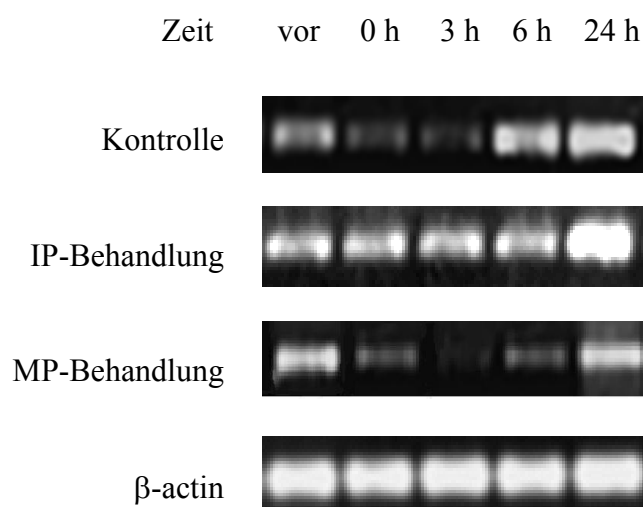


Abbildung 7: Darstellung der Proteinexpression von Cytochrom C im Zeitverlauf

Cytochrom C als cytosolischer Apoptosemarker zeigte in der Ischämiegruppe eine reduzierte Expression zu den Zeitpunkten 0 h und 6 h nach der Ischämie. Ein ähnliches Expressionsmuster zeigte sich bei MP-behandelten Tieren, die ebenfalls bei 0 h und 6 h kaum Cytochrom C mRNA in der Leber exprimierten. Allerdings war auch 6 h nach Reperfusion

immer noch kaum mRNA nach MP-Behandlung nachweisbar. Im Gegensatz hierzu war nach IP-Behandlung bereits vor Ischämie sowie zu allen Beobachtungszeitpunkten nach Reperfusion Cytochrom C mRNA deutlich nachweisbar (Abbildung 7).

#### Caspase 3 (36 KD)

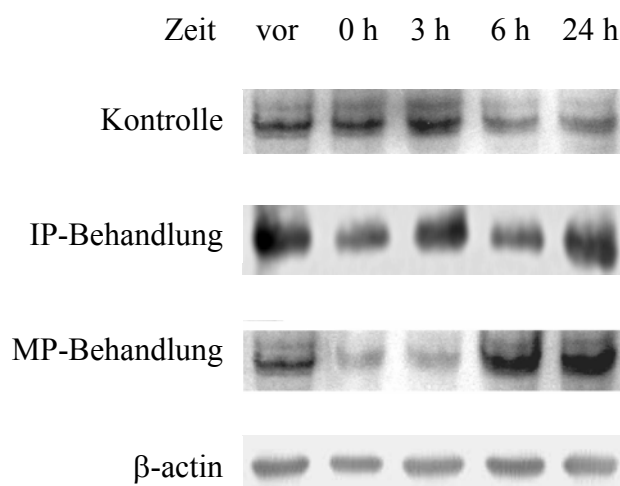


Abbildung 8: Darstellung der Proteinexpression von Caspase3/32 im Zeitverlauf

In der Kontrollgruppe konnte bereits zu frühen Zeitpunkten eine Expression von Caspase 3 nachgewiesen werden, wobei deren Aktivität nach 6 h und 24 h leicht abnahm. IP-behandelte Lebern zeigte bereits vor Ischämie eine starke Caspase 3 Expression, die unmittelbar nach Ischämie abnahm. Im weiteren Verlauf nahm diese an Aktivität jedoch wieder deutlich zu. Im Gegensatz dazu war in MP-behandelten Lebern zu den Zeitpunkten 0 h und 3 h nur eine sehr geringe Caspase 3 Expression zu verzeichnen. Hier kam es erst ab 6 h zu einem deutlichen Anstieg (Abbildung 8).

### 2.3 Inflammation (ICAM-1 mRNA, inflammatorisches Infiltrat, Myeloperoxidase)

ICAM-1 mRNA war bei unbehandelten Kontrolltieren unmittelbar nach der Reperfusion (0 h) deutlich geringer exprimiert und erreichte erst 6 h nach Reperfusion wieder

normale Ausgangswerte. Demgegenüber war die ICAM-1 mRNA Expression bei IP-behandelten Tieren zu keinem Zeitpunkt verändert und jederzeit gut nachweisbar. Bei MP-behandelten Tieren hingegen war zum Zeitpunkt 0 h, 3 h und 6 h nach Reperfusion keine ICAM-1 mRNA nachweisbar. Erst 24 h nach Reperfusion war ICAM-1 mRNA wieder in normaler Intensität vorhanden (Abbildung 9).

#### ICAM-1

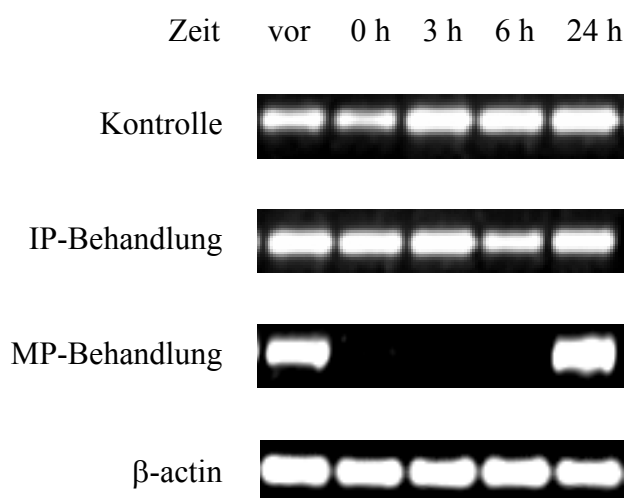


Abbildung 9: Darstellung der mRNA- Expression von ICAM-1 im Zeitverlauf

Die Auszählung des inflammatorischen Infiltrates zeigte signifikant weniger inflammatorische Zellen in den Lebern von IP- und MP-behandelten Tieren verglichen mit unbehandelten Kontrollen. Dieser Unterschied bestand jedoch nur unmittelbar nach der Reperfusion (0 h) und war zu späteren Beobachtungszeitpunkten nicht mehr vorhanden. Ebenfalls bestand kein Unterschied zwischen IP- und MP-behandelten Tieren (Tabelle 3).

Leukozytäres Infiltrat	Kontrolle	IP-Behandlung	MP-Behandlung
baseline	19.1 ± 5.4	22.5 ± 5.6	19.1 ± 5.4
0 h	48.4 ± 13.5 #	29.7 ± 8	24.6 ± 7
3 h	24.7 ± 7.1	16.2 ± 9	21 ± 5
6 h	29.9 ± 6.8	36.3 ± 5.7	24.3 ± 5.9
24 h	18.4 ± 4.7	33.7 ± 9.5	18.2 ± 7.3

Tabelle 3: Leukozytäres Infiltrat [n/Gesichtsfeld]. Angegeben sind Mittelwert ± SEM. # p<0,05 für Kontrolle versus IP und MP

Ein ähnliches Verteilungsmuster wie bei der leukozytären Infiltration sahen wir bei der Messung der Myeloperoxidasespiegel in der Leber. Diese waren ebenfalls 0 h nach Reperfusion in IP- und MP-behandelten Tieren signifikant reduziert gegenüber den Kontrolltieren ( $42,38 \pm 24,2$  mU/mg bzw.  $33,78 \pm 16,1$  mU/mg versus  $64,37 \pm 45,8$  mU/mg), zu späteren Beobachtungszeitpunkten jedoch ebenfalls ohne Unterschied. Ein statistischer Unterschied zwischen IP und MP Behandlung bestand auch hier nicht (Tabelle 4).

Myeloperoxidase	Kontrolle	IP-Behandlung	MP-Behandlung
baseline	23.93 ± 10.4	34.77 ± 8.3	22.8 ± 9.8
0 h	64.37 ± 45.8 #	42.38 ± 24.2	33.78 ± 16.1
3 h	12.21 ± 9	12.94 ± 6.9	27.81 ± 14.1
6 h	11.73 ± 7.9	12.65 ± 4.8	27.88 ± 12.8
24 h	26.29 ± 11.2	24.77 ± 12.8	19.31 ± 8

Tabelle 4: Myeloperoxidase-Spiegel [mU/mg]. Angegeben sind Mittelwert ± SEM. # p<0,05 für Kontrolle versus IP und MP

## 2.4. Nukleärer Transkriptionsfaktor NF<sub>κ</sub>B

In der Ischämiegruppe konnte bereits vor Ischämie eine geringe Aktivität von NF<sub>κ</sub>B nachgewiesen werden. Zum Zeitpunkt 0 h nach Reperfusion wurde ein Expressionsmaximum erreicht. Im weiteren Verlauf zeigte sich eine weitgehend konstante Expression von NF<sub>κ</sub>B, die gegenüber der Basalexpression vor der 45-minütigen Ischämie erhöht war. IP-behandelte Tiere wiesen bereits vor der 45-minütigen Leberischämie eine signifikant höhere NF<sub>κ</sub>B Bindungsaktivität aus. Hier beobachteten wir nach der Reperfusion eine stete Abnahme der Bindungsaktivität bis zum Beobachtungszeitpunkt 6 h nach Reperfusion. Interessanterweise war bei 24 h nach Reperfusion wieder eine starke NF<sub>κ</sub>B Bindungsaktivität in den Lebern der IP-behandelten Tieren nachweisbar.

Im Vergleich zu den Kontrolltieren war auch bei MP-behandelten Tieren eine erhöhte NF<sub>κ</sub>B Expression bereits vor der 45-minütigen Ischämie nachweisbar. Im weiteren Verlauf sahen wir dann eine deutliche Abnahme der NF<sub>κ</sub>B Bindungsaktivität, insbesondere zu den Beobachtungszeitpunkten 0 h und 3 h (verglichen mit IP-behandelten und unbehandelten Lebern). Auch in dieser Gruppe war nach 24 h wieder eine starke Expression zu verzeichnen gewesen (Abbildung 10).

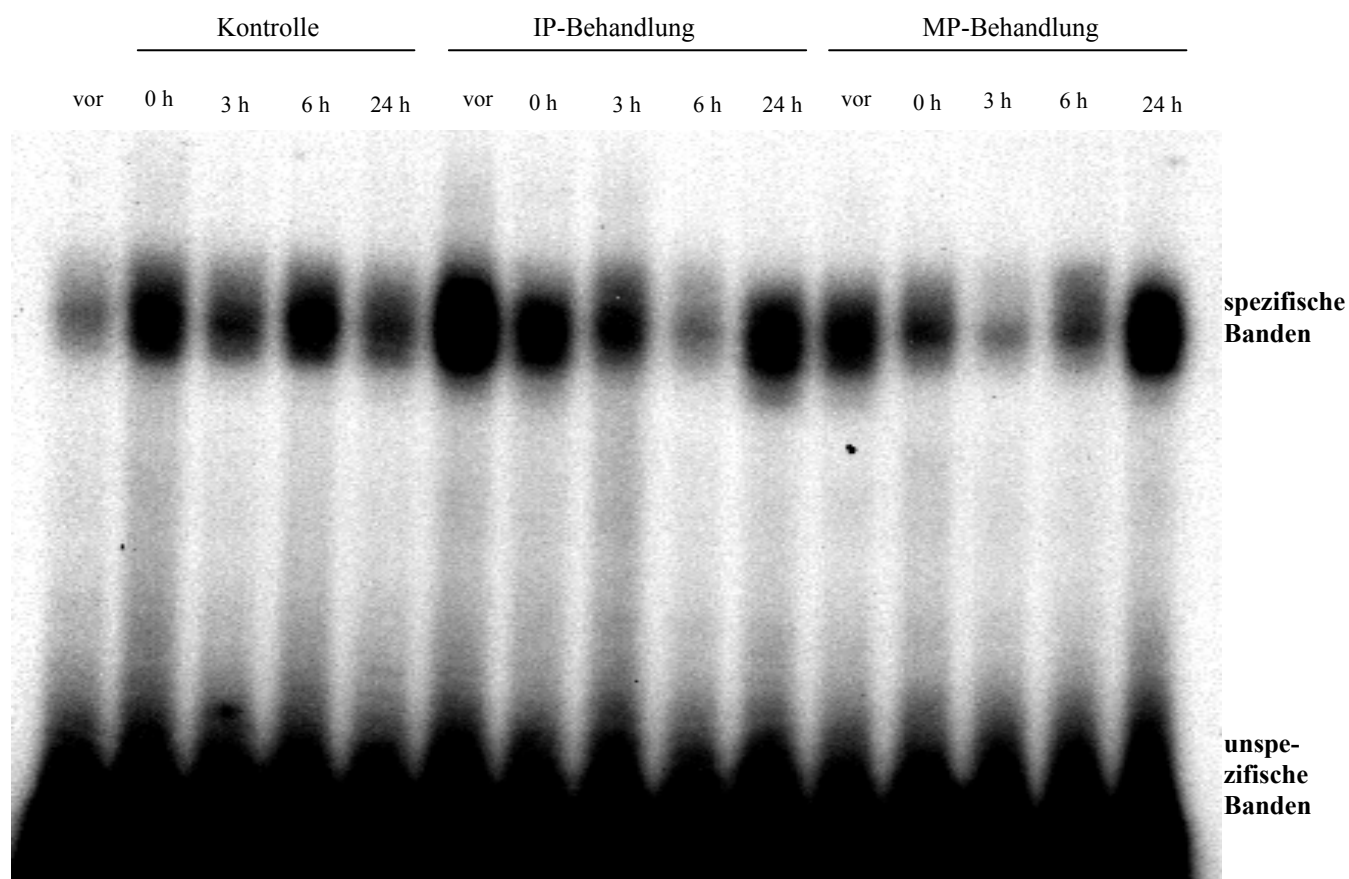


Abbildung 10: Darstellung der NF $\kappa$ B Kernproteinexpression

### Supershift und Competition

Durch den Supershift konnten die NF $\kappa$ B Anteile der Rel-Proteinfamilie nachgewiesen werden. Zu den einzelnen Untereinheiten gehören Rel A (p65), Rel B, c-Rel, NF $\kappa$ B1 p50 und NF $\kappa$ B2 p52 [Schmid 1994]. In der Competition-Analyse wurde bei zunehmender Konzentration unmarkierter DNA die spezifische Bindung von NF $\kappa$ B aufgrund der abnehmenden Signalintensität der spezifischen Banden nachgewiesen (Abbildung 11).

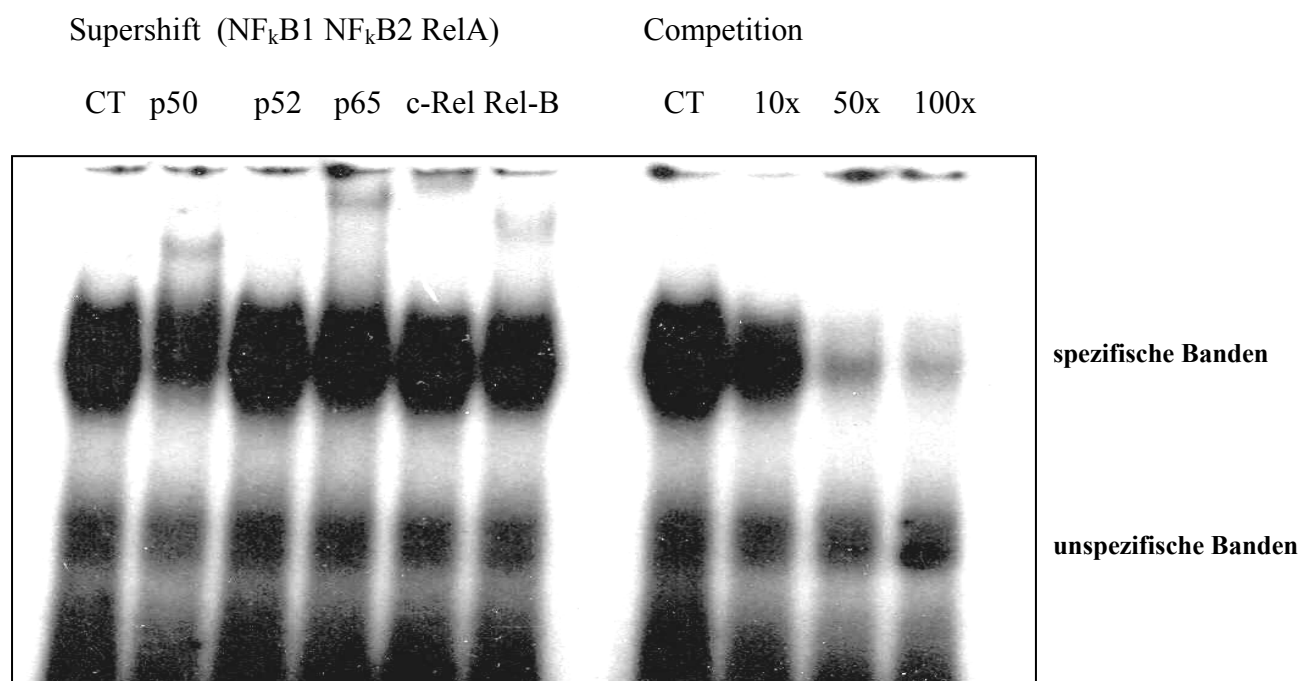


Abbildung 11: Darstellung der NF $\kappa$ B Untereinheiten NF $\kappa$ B1 p50, NF $\kappa$ B2 p52, RelA p65, c-Rel, Rel-B mittels Supershift- und Competitionanalyse

## 2.5. Mikrozirkulation (sinusoidale Perfusion, Leukozyten/Endothelzell-Interaktion, NADH-Fluoreszenz, Gallefluß)

Die Analyse der Mikrozirkulation wurde bei IP-behandelten und unbehandelten Tieren durchgeführt. Zur Quantifizierung des postischämischen Perfusionsausfalls wurden die perfundierten Sinusoide prozentual im Verhältnis zu den nicht perfundierten Sinusoide angegeben. Es bestand eine signifikante Verbesserung der sinusoidalen Perfusion in der IP-behandelten Gruppe im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. 30 min nach der Reperfusion zeigte sich in der unbehandelten Kontrollgruppe ein Abfall der perfundierten Sinusoide auf  $28,39 \pm 10,51\%$ . In der IP-behandelten Gruppe lag die Perfusionsrate hingegen bei  $75,59 \pm 7,54\%$  ( $p < 0,01$ ). 90 min nach Reperfusion war die Perfusion in der unbehandelten Kontrollgruppe weiter bis auf  $23,89 \pm 8,96\%$  abgefallen, während in der IP-behandelten Gruppe die sinusoidale Perfusion noch bei  $66,68 \pm 11,35\%$  lag ( $p < 0,05$ ) lag (Abbildung 12).

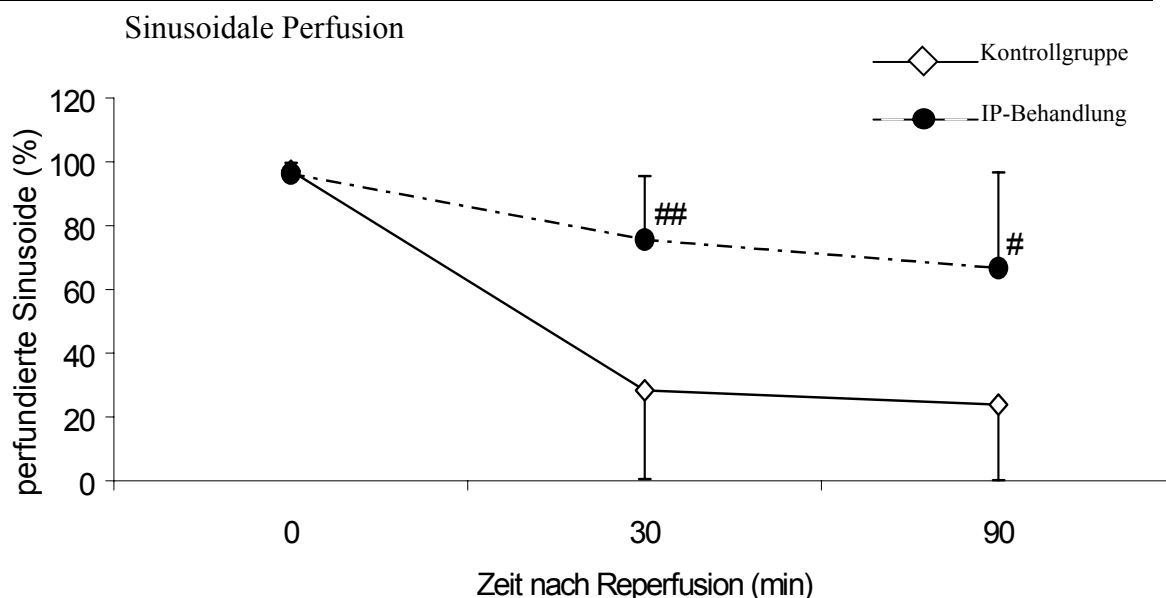


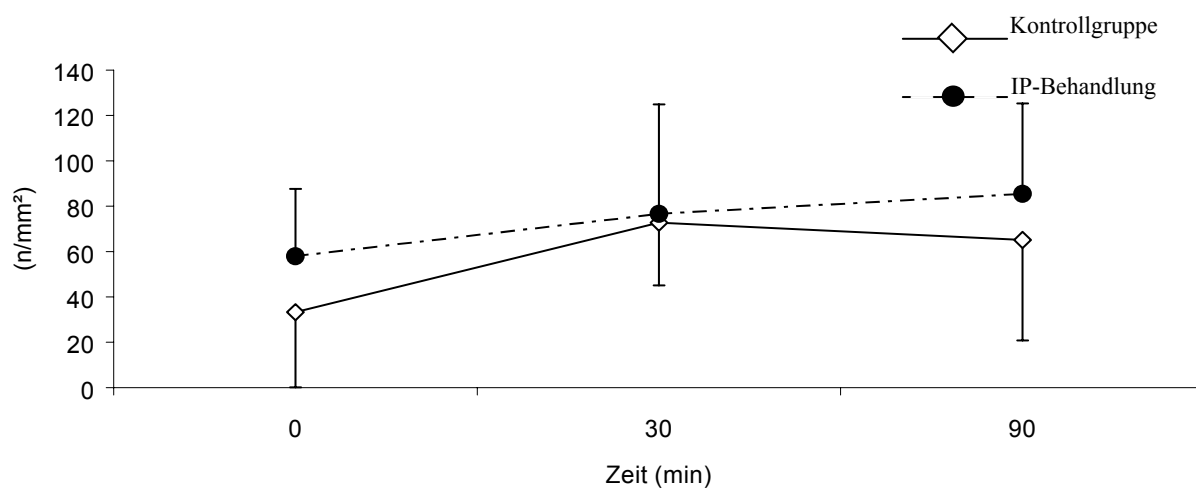
Abbildung 12: Darstellung der sinusoidalen Perfusion in der Rattenleber nach einer 45 minütigen warmer Ischämie. Angegeben sind Mittelwert  $\pm$  SEM. #  $p<0,05$ ; ##  $p<0,01$

Zur Darstellung der sinusoidal stagnierenden Leukozyten wurde die Anzahl der Leukozyten pro  $\text{mm}^2$  Endothelzelloberfläche ausgezählt [Vollmar 1994]. Es zeigte sich in beiden Gruppen eine leichte Zunahme der stagnierenden Leukozyten. Die Ausgangswerte betrugen in der unbehandelten Kontrollgruppe  $33 \pm 13$  Leukozyten/ $\text{mm}^2$  und in der IP-behandelten Gruppe  $58 \pm 11$  Leukozyten/ $\text{mm}^2$ . 30 min nach Reperfusion ( $73 \pm 12$  vs  $77 \pm 18$  Leukozyten/ $\text{mm}^2$ ) sowie 90 min nach Reperfusion ( $65 \pm 22$  vs  $85 \pm 16$  Leukozyten/ $\text{mm}^2$ ) zeigten sich jeweils keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen (Abbildung 13 A).

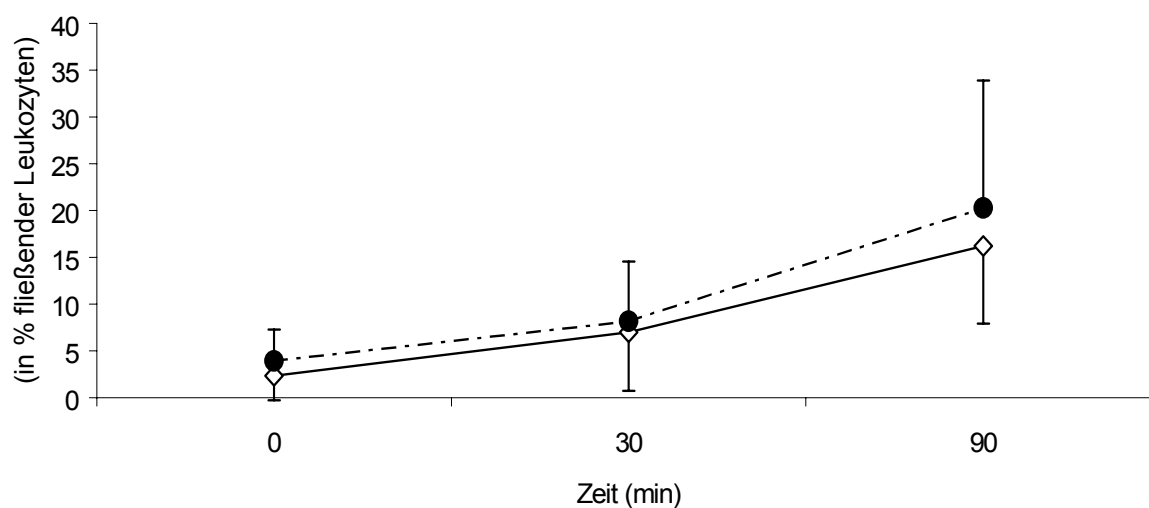
Die Auswertung der leukozytären Adhärenz in den postsinusoidalen Venolen ergab ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede. Sowohl die Anzahl der temporär anhaftenden Leukozyten (=Roller, Abbildung 13 B) als auch die Anzahl der permanent adhäsiven Leukozyten (=Sticker) (Abbildung 13 C) zeigte jeweils eine Zunahme der leukozytären Adhärenz, jedoch ohne Unterschied zwischen beiden Behandlungsgruppen.



### A Sinusoidal stagnierende Leukozyten



### B Postsinusoidal temporär adhärenente Leukozyten



### C Postsinusoidal stagnierende Leukozyten

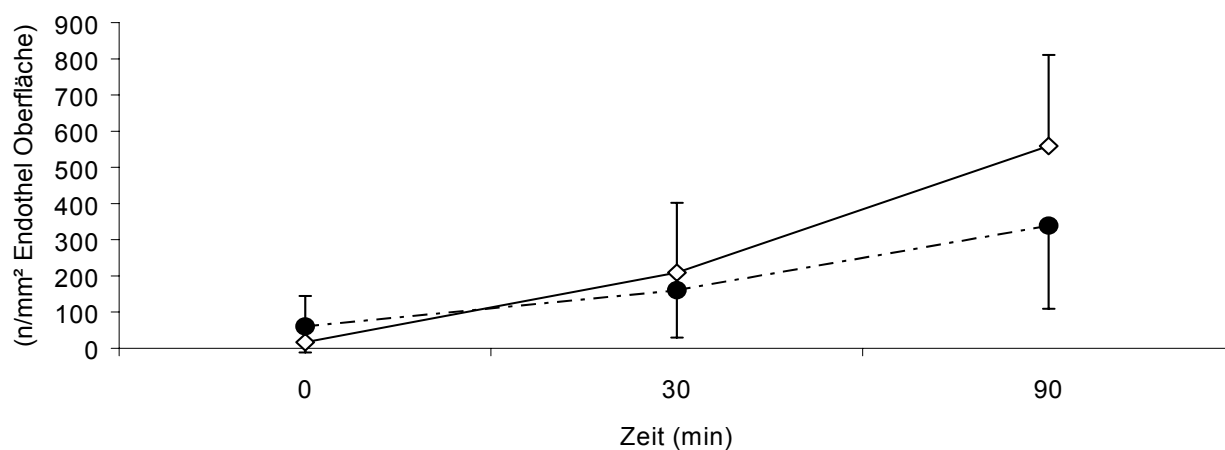


Abbildung 13: Darstellung der sinusoidalen und postsinusoidalen Leukozytenadhärenz nach 45-minütiger warmer Leberischämie. Angegeben sind Mittelwert  $\pm$  SEM

Die Messung der NADH Fluoreszenz der Leberparenchymoberfläche bei unbehandelten Kontrolltieren zeigte eine Zunahme von nahezu 30% gegenüber der präischämischen Basalmessung zu den Beobachtungszeitpunkten 30 min und 90 min nach Reperfusion (Tabelle 5). IP-Behandlung dahingegen führte zu einer geringeren Zunahme der NADH Fluoreszenz, was auf einen verbesserten Sauerstofftransport in das Gewebe und damit auf eine verbesserte hepatozelluläre mitochondriale Funktion schließen ließ. Diese Beobachtung wurde durch die Messung der GLDH Serumkonzentration unterstützt. Bereits 6 h nach Reperfusion fand sich eine statistisch signifikant niedrigere GLDH Konzentration im Serum IP-behandelter Tiere ( $34 \pm 13$  vs.  $133 \pm 67$  U/l).

NADH Fluoreszenz [aU]	Kontrolle	IP-Behandlung
Basalwert	$120 \pm 3$	$125 \pm 4$
30 min	$156 \pm 17$ *	$134 \pm 8$ #
90 min	$156 \pm 22$ *	$139 \pm 9$

Tabelle 5: NADH Fluoreszenz [aU]. Angegeben sind Mittelwert  $\pm$  SEM. #  $p < 0,05$  für Kontrolle versus IP; \*  $p < 0,05$  für Kontrolle versus Basalwert.

Entsprechend der verbesserten sinusoidalen Perfusion und der verbesserten mitochondrialen Sauerstoffversorgung erschien auch die Messung der Leberfunktionsparameter bei IP-behandelten Tieren verbessert. Dabei erwies sich die postischämische Galleproduktion als statistisch signifikant besser gegenüber den unbehandelten Kontrolltieren (Abbildung 14). Hierbei korrelierte der gemessene Gallefluß signifikant mit der sinusoidalen Perfusion ( $p < 0,01$ ,  $r = 0,84$ ).

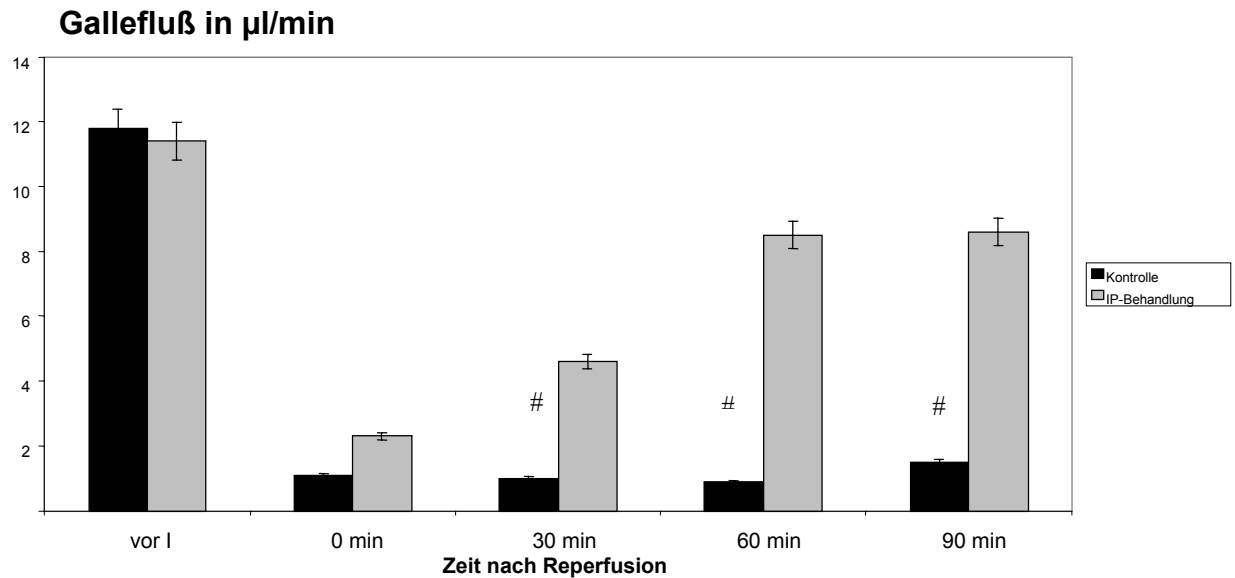


Abbildung 14: Gallefluß nach 45-minütiger Leberischämie in IP-behandelten und unbehandelten Kontrolltieren. Angegeben sind Mittelwert  $\pm$  SEM. #  $p < 0,05$  für Kontrolle versus IP

## 2.6. Zusammenfassung Projekt 2

- Signifikante Reduktion der IR Schädigung innerhalb von 24 h nach Reperfusion durch IP- und MP-Behandlung gemessen an den Serumkonzentrationen leberspezifischer Enzyme und histomorphologischer Kriterien.
- Reduktion apoptotischer, d.h. TUNEL positiver Zellen gleichermaßen durch IP- und MP-Behandlung. Apoptotische Gene (Cytochrom C mRNA, Caspase 3 Protein) wurden jedoch nur nach MP-Behandlung signifikant geringer exprimiert.
- Reduktion des inflammatorischen Infiltrates und der Myeloperoxidase unmittelbar nach Reperfusion gleichermaßen durch IP- und MP-Behandlung. Expression von ICAM-1 mRNA jedoch nur nach MP-Behandlung signifikant reduziert im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen.
- Reduktion der NF $\kappa$ B Bindungsaktivität in MP-behandelten Lebern.

- Erhalt der postischämischen Mikrozirkulation nach IP-Behandlung mit signifikant besserer Sauerstoffversorgung der Leber.

### 3. Projekt 3 – warme Leberischämie und partielle Hepatektomie (70%)

#### 3.1. Resektion und hepatozellulärer IR Schaden (Serumkonzentrationen AST, ALT, GLDH)

Bei dieser Versuchsreihe überlebten alle Tiere die 70%-ige Leberresektion, die während einer 30-minütigen Leberischämie durchgeführt wurde. Es wurden 5,9 bis 6,7 g Lebergewebe reseziert, was ca. 2,5 vol.% des Körpergewichts entsprach. Die postischämische Ausschüttung der Serumtransaminasen AST, ALT und GLDH war 6 h nach Reperfusion in beiden Behandlungsgruppen signifikant niedriger als in der unbehandelten Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ). Wenngleich tendentiell niedrigere Werte in der IP-Gruppe verglichen mit der MP-Gruppe gemessen wurden, war dieser Unterschied nicht signifikant (Tabelle 6).

Parameter	Kontrolle	IP-Behandlung	MP-Behandlung
Körpergewicht (gramm)	253,7 ± 14	254,8 ± 17	242,5 ± 8
Gewicht Resektat (gramm)	6,7 ± 0,8	6,1 ± 0,8	5,9 ± 0,7
Resektat / Körpergewicht (vol.%)	2,6 ± 0,4	2,4 ± 0,5	2,4 ± 0,6
AST nach 6 h (U/l)	467 ± 46 #	128 ± 68	287 ± 116
ALT nach 6 h (U/l)	552 ± 177 #	142 ± 74	288 ± 129
GLDH nach 6 h (U/L)	128 ± 48 #	24 ± 7	46 ± 29

Tabelle 6: Körpergewicht, Gewicht der resezierten Leber und Verhältnis von Resektat zu Körpergewicht sowie die Serumkonzentrationen von AST, ALT und GLDH 6 h nach Reperfusion. Angegeben sind Mittelwert ± SEM. #  $p < 0,05$  für Kontrolle versus IP und MP

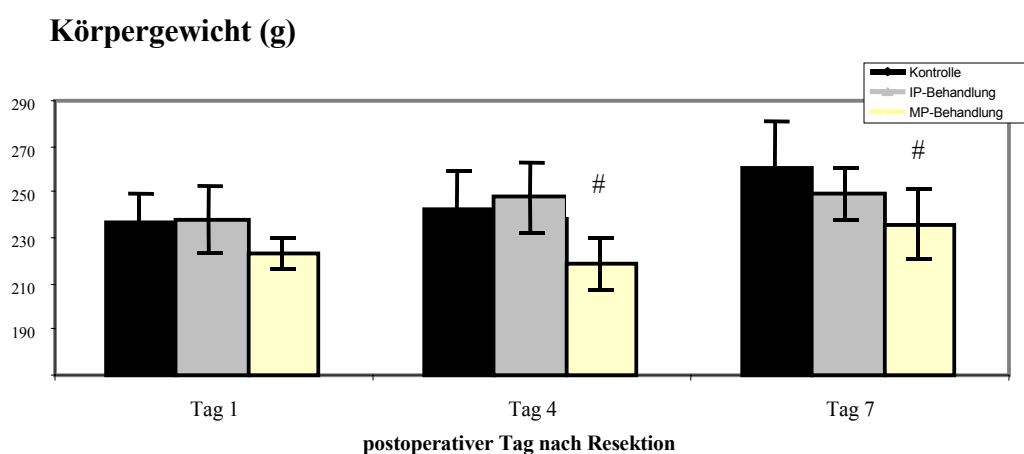
### 3.2. Regeneration (Körpergewicht, Lebergewicht, prozentuales Lebervolumen)

Während des postoperativen Verlaufs kam es zu einer konstanten Zunahme des Körpergewichts bei IP-behandelten und unbehandelten Kontrolltieren. Im Gegensatz dazu war bei MP-behandelten Tieren die Körpergewichtszunahme geringer und zeigte an Tag 4 und Tag 7 nach der Operation signifikant niedrigere Werte an (Abbildung 15 A).

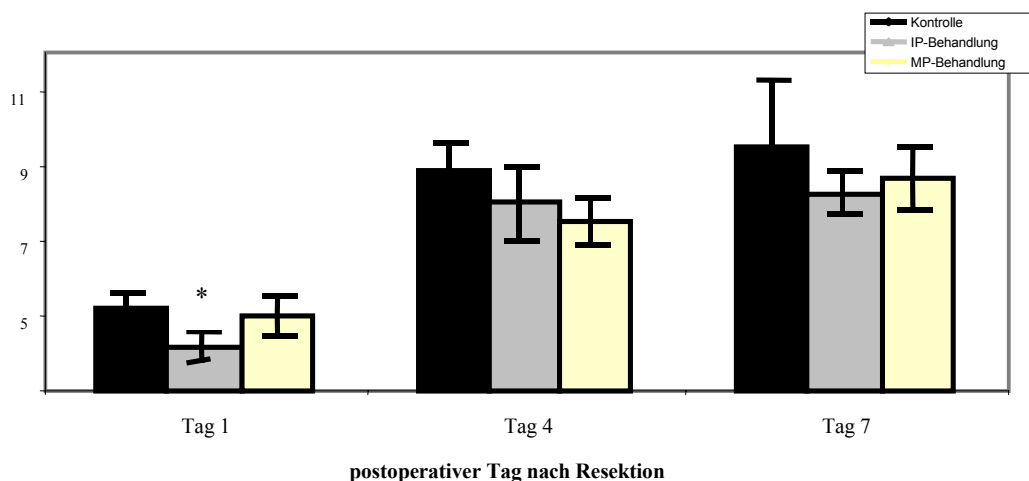
Das Gewicht der regenerierenden Leber betrug an Tag 1 ca 5 g und nahm bis zum vierten postoperativen Tag sprunghaft in allen Gruppen bis ca 8,5 g zu. Die weitere Gewichtszunahme bis zum Tag 7 war nicht mehr so ausgeprägt. Unterschiede zwischen den Gruppen bestanden an Tag 1, wo die Lebern von IP-behandelten Tieren signifikant leichter waren als bei unbehandelten Kontrolltieren (Kontrolle:  $5,2 \pm 0,4$  g, IP-Behandlung:  $4,16 \pm 0,4$  g, MP-Behandlung:  $4,9 \pm 0,5$  g) (Abbildung 15 B). Dieser Unterschied bestand auch noch bei der Ratio von verbleibender Leberparenchymmasse zu Körpergewicht (Kontrolle:  $2,2 \pm 0,3$  vol%, IP-Behandlung:  $1,7 \pm 0,2$  vol%, MP-Behandlung:  $2,2 \pm 0,3$  vol%).

Demgegenüber war bei MP-behandelten Tieren das Gewicht der verbleibenden Leber, sowie das Lebervolumen bezogen auf das Körpergewicht gleichermaßen von Tag 1 bis Tag 4 angestiegen, so daß wie auch an allen anderen postoperativen Tagen keine statistisch signifikanten Unterschiede zu unbehandelten Kontrollen bestanden (Abbildung 15 C).

A



B

**Gewicht der regenerierenden Leber (g)**

C

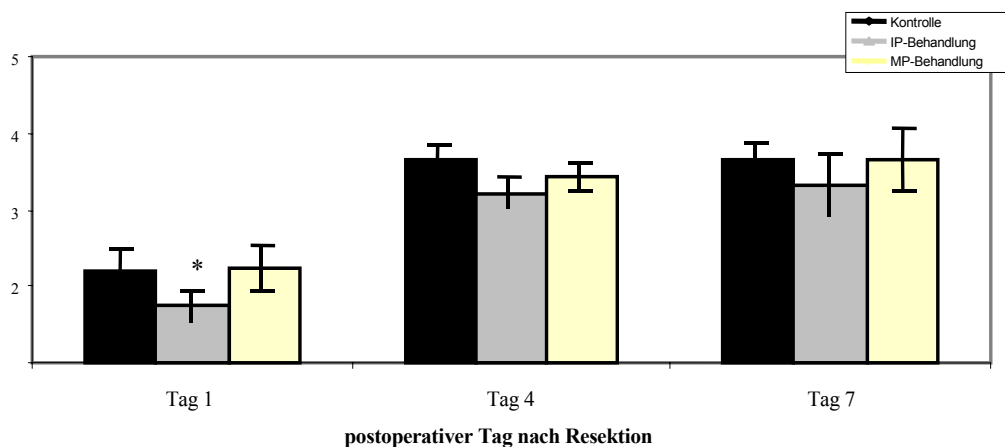
**Gewicht Restleber / Körpergewicht (vol%)**

Abbildung 15: Körpergewicht (A), Restparenchym (B) und Restleber pro Körpergewicht (C) nach Leberresektion. Angegeben sind Mittelwert  $\pm$  SEM. #  $p < 0,05$  für Kontrolle versus MP. \*  $p < 0,05$  für Kontrolle versus IP

Bei der laborchemischen Analyse der hepatozellulären Schädigungsparameter fiel bei IP-behandelten Tieren eine signifikant höhere AST und ALT Serumkonzentration gegenüber MP-behandelten und unbehandelten Kontrolltieren an Tag 1 nach Resektion auf. Vergleichbar waren die Ergebnisse hingegen für Albumin und Bilirubin im Serum der Tiere. Während bei MP-behandelten sowie bei unbehandelten Kontrolltieren die Leberenzyme an Tag 1 bereits

gegenüber der 6 h Messung abgesunken waren, sahen wir nach IP-Behandlung einen deutlichen Anstieg von AST und ALT ( $128 \pm 68$  auf  $435 \pm 167$  sowie  $142 \pm 74$  auf  $325 \pm 105$ ). Dieser Anstieg war jeweils statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ). Bei MP-behandelten Tieren bestanden keine Unterschiede zu unbehandelten Kontrolltieren für AST, ALT und Bilirubinwerte. Lediglich die Serumalbuminkonzentration war bei MP-behandelten Tieren signifikant niedriger an Tag 4 (Tabelle 7).

Parameter	Kontrolle	IP-Behandlung	MP-Behandlung
AST (U/l)			
Tag 1	$340 \pm 106$	$435 \pm 167 \#$	$279 \pm 93$
Tag 4	$32 \pm 2$	$37 \pm 6$	$47 \pm 17$
Tag 7	$27 \pm 8$	$31 \pm 3$	$37 \pm 4$
ALT /U/l)			
Tag 1	$143 \pm 43$	$325 \pm 105 \#$	$187 \pm 79$
Tag 4	$25 \pm 3$	$23 \pm 3$	$20 \pm 7$
Tag 7	$24 \pm 4$	$22 \pm 4$	$24 \pm 4$
Albumin (mg/dl)			
Tag 1	$3 \pm 0,1$	$3 \pm 0,29$	$2,98 \pm 0,3$
Tag 4	$2,98 \pm 0,1$	$2,95 \pm 0,2$	$2,6 \pm 0,2 *$
Tag 7	$3,05 \pm 0,2$	$3,02 \pm 0,2$	$3 \pm 0,2$
Bilirubin (mg/dl)			
Tag 1	$0,36 \pm 0,02$	$0,37 \pm 0,1$	$0,32 \pm 0,1$
Tag 4	$0,05 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,03$	$0,07 \pm 0,03$
Tag 7	$0,1 \pm 0,03$	$0,05 \pm 0,03$	$0,05 \pm 0,03$

Tabelle 7: Laborchemische Analysen von AST, ALT, Albumin und Bilirubin. Angegeben sind Mittelwert  $\pm$  SEM. #  $p < 0,05$  für IP versus Kontrolle und MP. \*  $p < 0,05$  für MP versus IP und Kontrolle



### 3.3. Regeneration (Ki-67 Färbung, Mitose Index)

An Tag 1 nach 70%-iger Leberresektion waren die Regenerationsparameter Ki-67 und Mitose Index bei den unbehandelten Kontrolltieren in maximaler Konzentration nachweisbar ( $14,5 \pm 6$  % Ki-67 positive und  $10,1 \pm 2,6$  mitotische Hepatozyten). Bereits an Tag 4 war keine erhöhte mitotische Aktivität mehr nachweisbar, auch die Anzahl Ki-67 positiver Zellen nahm bereits an Tag 4 deutlich ab (Abbildung 16).

Nach IP-Behandlung war am ersten Tag keine Aktivitätszunahme zu beobachten. Analog zur verminderten Leberparenchymmasse war zu diesem Zeitpunkt sowohl die Anzahl mitotischer Zellen ( $1,4 \pm 2,6$ ) als auch die der Ki-67 positiven Hepatozyten ( $0,8 \pm 0,5$  %) signifikant vermindert.

Nach MP-Behandlung war eine ähnliche Kinetik der Regenerationsparameter zu beobachten wie bei unbehandelten Kontrollen. Dem starken Aktivitätsanstieg an Tag 1 folgte eine Normalisierung bis hin zu Tag 7. Dabei sahen wir einen höheren Mitose Index aber eine geringere Anzahl Ki-67 positiver Hepatozyten, jedoch ohne statistisches Signifikanzniveau zu erreichen (Abbildung 16).

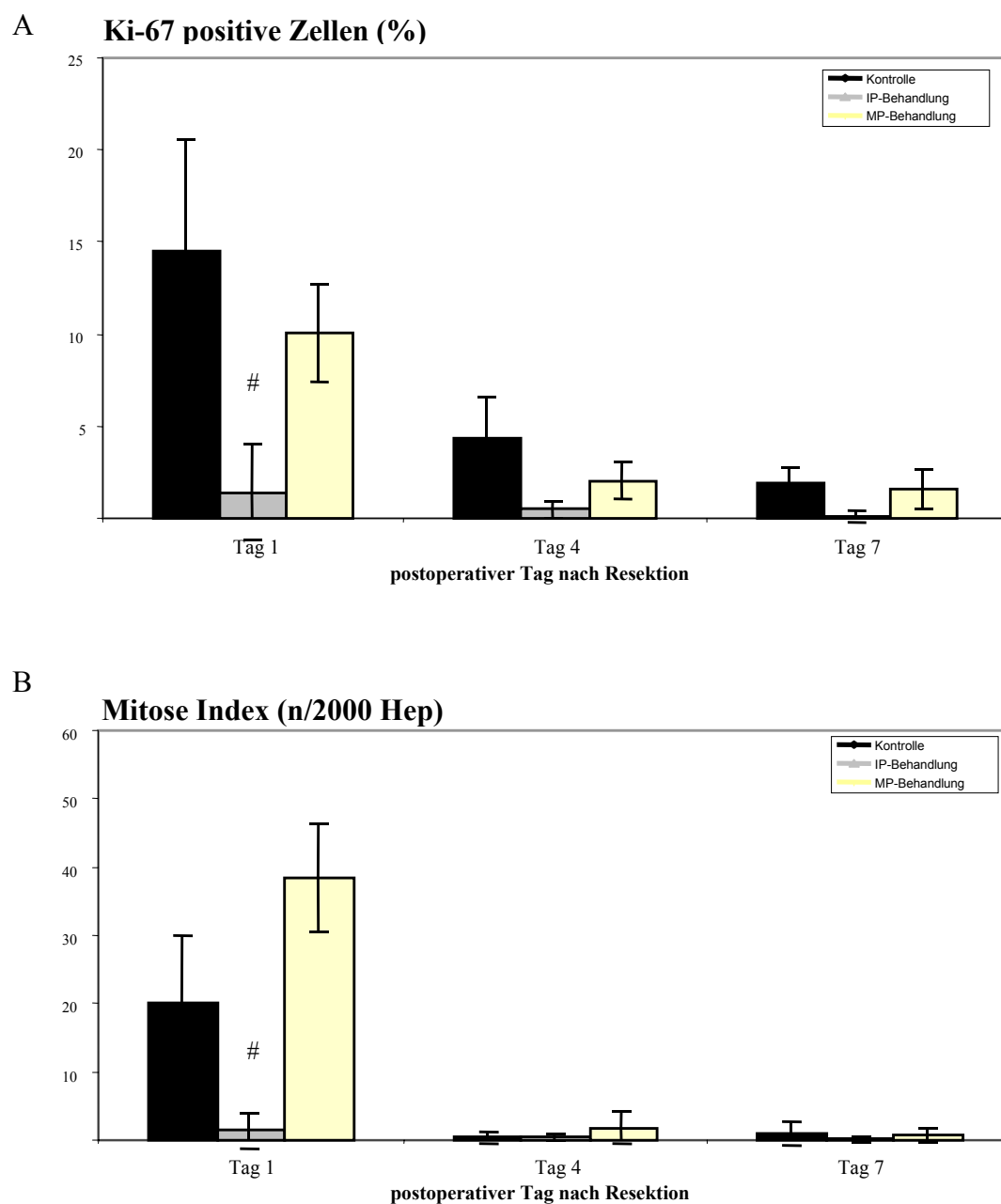


Abbildung 16: Ki-67 positive Hepatozyten (A) und Mitose Index (B) als Regenerationsparameter nach 70%-iger Leberresektion. Angegeben sind Mittelwert  $\pm$  SEM.  
 #  $p < 0,05$  für IP versus Kontrolle und MP



Abbildung 17: Repräsentative Immunhistochemische Färbungen mit Darstellung von Ki-67 positiven Hepatozyten an Tag 1 nach Resektion (600-fach)

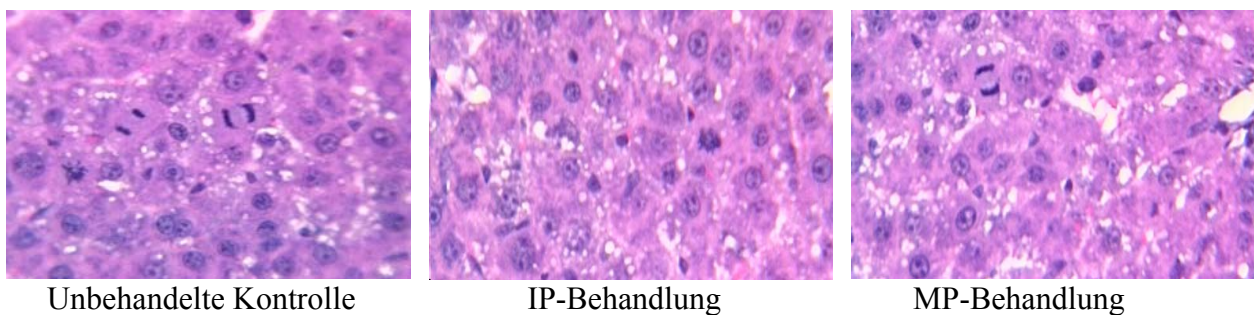


Abbildung 18: Repräsentative HE-Färbungen mit Darstellung von mitotischen Hepatozyten an Tag 1 nach Resektion (600-fach)

### 3.4. Zusammenfassung Projekt 3

- Signifikante Reduktion der IR Schädigung durch IP- und MP-Behandlung gemessen an den Serumkonzentrationen leberspezifischer Enzyme 6 h nach 70%-iger Resektion mit 30-minütiger warmer Organischämie
- Deutliche Beeinträchtigung der hepatozellulären Regeneration am ersten postoperativen Tag nach 70%-iger Resektion durch vorherige IP-Behandlung gemessen an der Anzahl Ki-67 positiver und mitotischer Hepatozyten
- Unbeeinträchtigte hepatozelluläre Regeneration nach 70%-iger Resektion bei vorheriger MP-Behandlung

#### 4. Projekt 4 – warme Leberischämie und partielle Hepatektomie (90%)

##### 4.1. Überleben

Das Ausmaß der Resektion war in allen Gruppen vergleichbar und betrug mit jeweils  $7,57 \pm 0,5$  g,  $8,01 \pm 0,4$  g und  $8,05 \pm 0,3$  in den jeweiligen Behandlungsgruppen ca. 3 vol% des Gesamtgewichts (Tabelle 8).

Wie bei diesem Modell zu erwarten, überlebte die Mehrzahl der Tiere nicht den Beobachtungszeitraum von insgesamt 21 Tagen. Dabei beobachteten wir signifikante Unterschiede beim Überleben zwischen den Behandlungsgruppen. Nach 90%-iger Leberresektion mit 30 minütiger warmer Leberischämie überlebten 10% aller Kontrolltiere und 20% aller MP-behandelten Tiere. Nach IP-Behandlung überlebte jedoch kein Tier länger als drei Tage (Abbildung 19). Das Überleben in der IP-Gruppe war somit signifikant reduziert verglichen zur MP-Gruppe ( $p < 0,01$ ).

Parameter	Kontrolle	IP-Behandlung	MP-Behandlung
Körpergewicht (gramm)	$248 \pm 11$	$252,4 \pm 11$	$252,1 \pm 10$
Gewicht Resektat (gramm)	$7,57 \pm 0,5$	$8,01 \pm 0,4$	$8,05 \pm 0,3$
Resektat / Körpergewicht (vol.%)	$3,05 \pm 0,3$	$3,17 \pm 0,3$	$3,19 \pm 0,4$

Tabelle 8: Körpergewicht, Gewicht der resezierten Leber und Verhältnis von Resektat zu Körpergewicht. Angegeben sind Mittelwert  $\pm$  SEM.

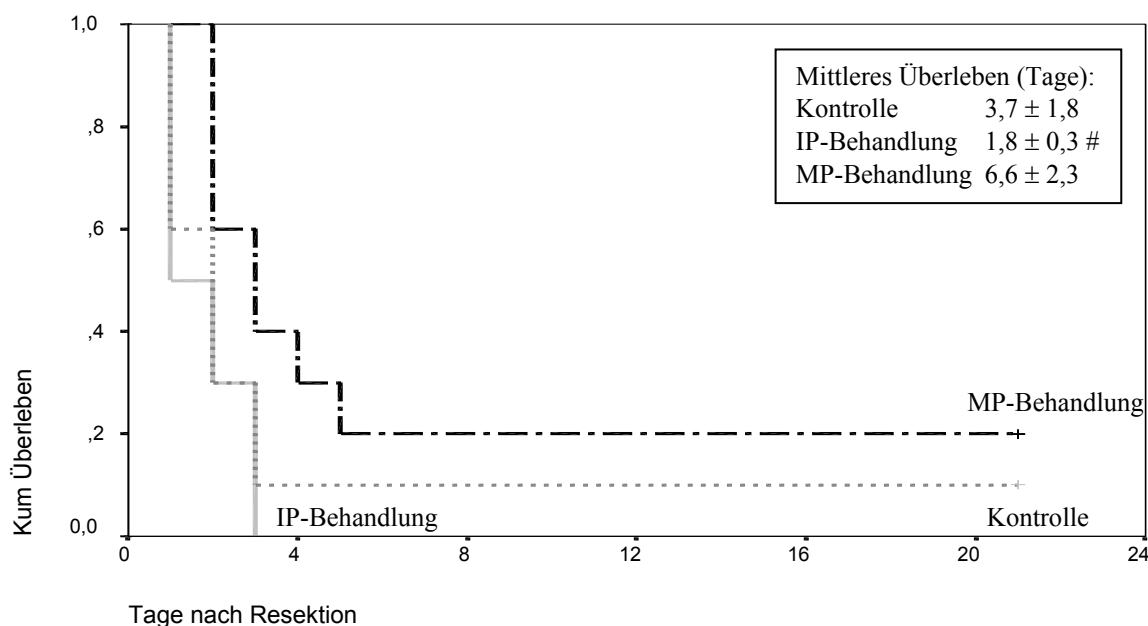


Abbildung 19: Überleben nach 90%-iger Leberresektion. #  $p < 0,05$  für IP-Behandlung versus MP-Behandlung.

#### 4.2. Laserdopplerflowmetrie

Die Flußmessung über der Pfortader erbrachte signifikant höhere postischämische portalvenöse Flußraten nach IP-Behandlung verglichen mit der Kontrollgruppe in der frühen Phase nach Reperfusion. IP-behandelte Tiere zeigten einen schnelleren Anstieg der portalvenösen Flußrate nach Reperfusion, der jedoch auch nach 10 min noch deutlich unter den Basalflußraten lag. Im Gegensatz hierzu war bei unbehandelten Kontrollen eine Zunahme der portalvenösen Flußrate erst ab der dritten Minute nach Reperfusion zu beobachten. Insgesamt jedoch war die portalvenöse Durchblutung jedoch signifikant reduziert in unbehandelten Kontrollen verglichen mit IP-behandelten Tieren. Nach MP-Behandlung sahen wir auch eine frühe Zunahme der Pfortaderperfusion (Minute 1), dennoch war im weiteren Verlauf keine weitere Zunahme der Flußrate zu sehen, so daß 10 min nach Reperfusion auch ein signifikant niedrigerer Wert verglichen zur IP-Behandlung resultierte (Abbildung 20).

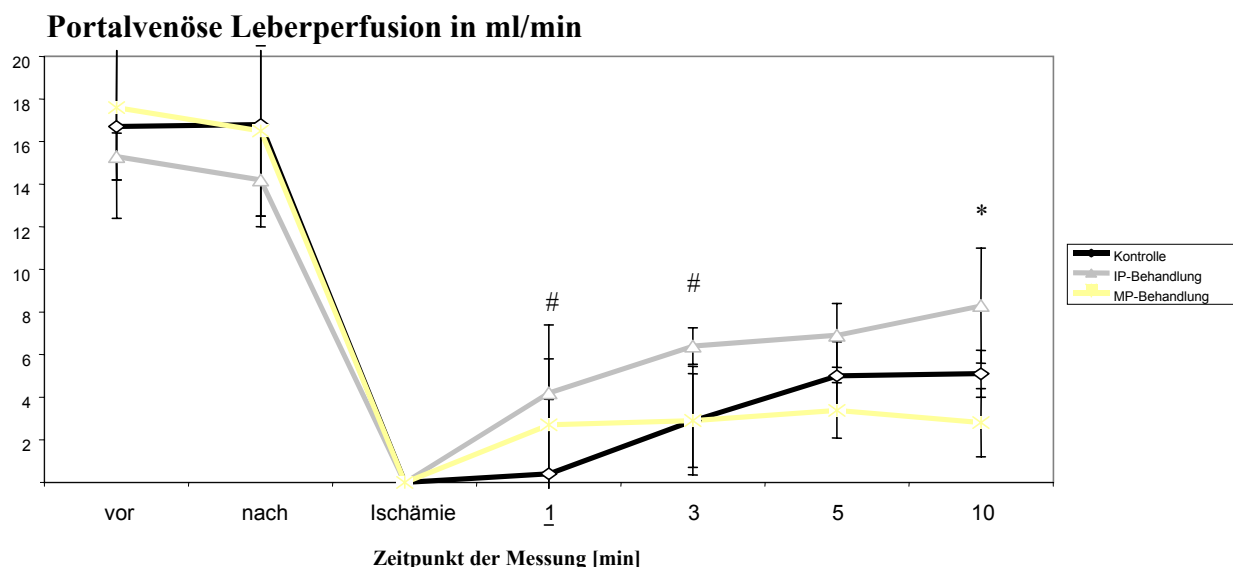


Abbildung 20: Portale Leberperfusion nach 90%-iger Leberresektion. Angegeben sind Mittelwert  $\pm$  SEM. #  $p < 0,05$  für IP-Behandlung versus Kontrolle. \*  $p < 0,05$  für IP-Behandlung versus Kontrolle und MP-Behandlung

#### 4.3. Mikrozirkulation (sinusoidale Perfusion, velocity, volumetric blood flow, Leukozyten/Endothelzell-Interaktion)

Da bei ausgedehnt resezierten, sogenannten small-for-size Lebern keine Unterschiede zwischen unbehandelten und MP-behandelten Tieren bestanden, wurde die intravital-mikroskopische Analyse fokussiert auf den Einfluß der IP-Behandlung auf die hepatische Mikrozirkulation und daher IP-behandelte mit unbehandelten Kontrolltieren verglichen.

Die Intravitalmikroskopie zeigte 30 min nach Resektion bzw. Reperfusion einen geringeren postischämischen Perfusionsausfall in den IP-behandelten Tieren als bei unbehandelten Kontrolltieren. Hierbei waren nach 90%-iger Resektion und vorheriger IP-Behandlung noch  $95,1 \pm 1,6$  % aller Sinusoide perfundiert. Bei unbehandelten Kontrolltieren waren es immerhin noch  $91,3 \pm 2,4$  % (Abbildung 21).

Interessanterweise sahen wir, unabhängig von der Behandlungsgruppe (IP- oder unbehandelt), bei resezierten Lebern in der frühen Phase nach Reperfusion deutlich mehr

offene und frei perfundierte Sinusoide als bei nicht resezierten Lebern. Bei letzteren betrug die Perfusionsrate 30 min nach Reperfusion nur noch  $28,39 \pm 10,5$  % in der Kontrollgruppe bzw.  $75,59 \pm 7,5$  % in der IP-Gruppe. Da die resezierten Lebern 30 min warme Ischämie durchliefen (im Gegensatz zu 45 min bei nicht resezierten Lebern), wurde auf einen statistischen Vergleich verzichtet.

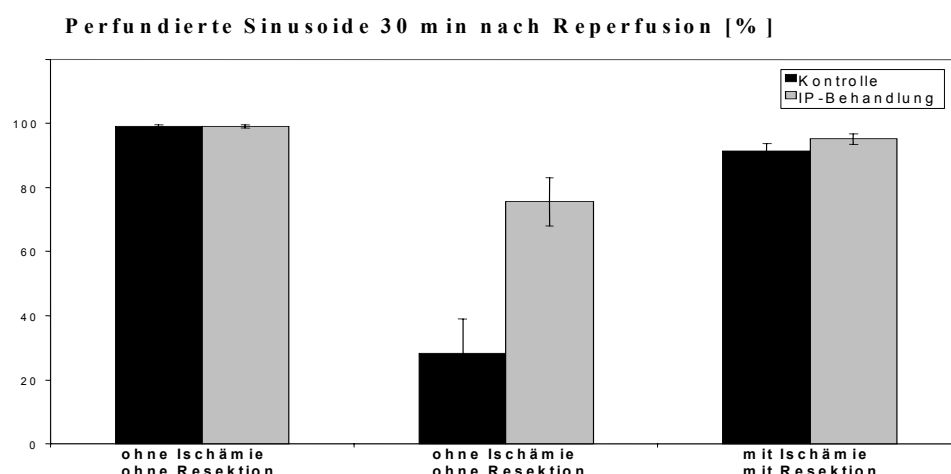


Abbildung 21: Perfundierte Sinusoide nach 30-minütiger Ischämie ohne bzw. mit Resektion

Die in vivo gemessene postischämische erythrozytäre Flußrate (velocity) war sowohl in den analysierten Venolen wie auch in den Sinusoiden 30 min nach Reperfusion signifikant erhöht nach IP-Behandlung verglichen mit unbehandelten Kontrollen (Abbildung 22 A). Gleichsinnig hierzu war die Analyse der erythrozytären Flußrate bezogen auf den Gefäßdurchmesser (volumetric blood flow). Signifikant höhere Flußraten, insbesondere wiederum in den Venolen, waren nach Resektion in den Lebern von IP-behandelten Tieren zu messen, während die volumetric blood flow in den Sinusoiden tendentiell (jedoch nicht statistisch signifikant) erhöht war (Abbildung 22 B). Die leukozytäre Antwort wie auch die NADH Fluoreszenzmessung waren in beiden Gruppen gleich (Tabelle 9).

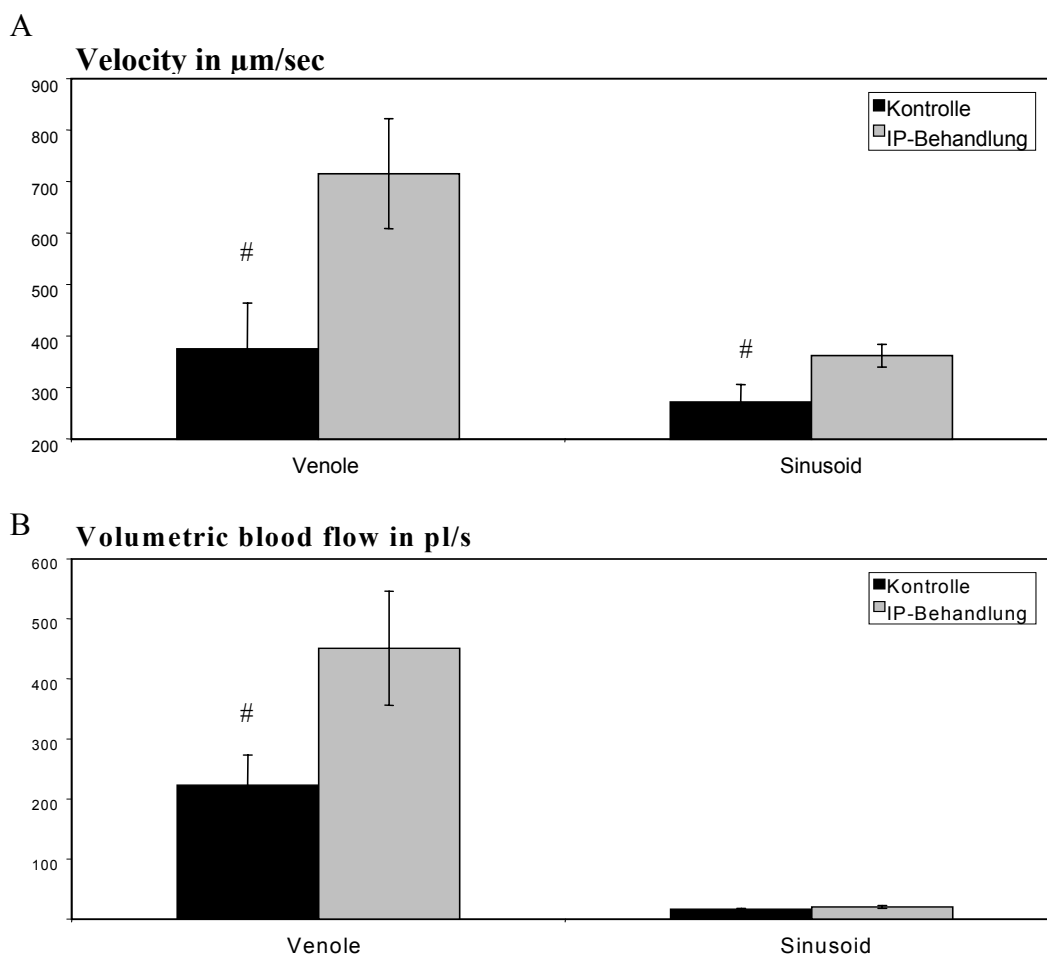


Abbildung 22: Velocity (A) und Volumetric blood flow (B) nach 90%-iger Leberresektion mit 30 min warmer Ischämie. Angegeben sind Mittelwert  $\pm$  SEM. #  $p < 0,05$  für IP versus Kontrolle

Parameter	Kontrolle	IP-Behandlung
Leukozytenadhärenz [ $\text{n}/\text{mm}^2$ ]		
Venole	$99,6 \pm 27$	$110,7 \pm 36$
Sinusoid	$26,3 \pm 8$	$22,9 \pm 7$
NADH Fluoreszenz [aU]	$111,1 \pm 19,3$	$103,4 \pm 25,3$

Tabelle 9: Leukozytenadhärenz und NADH Fluoreszenz nach 90%-iger Leberresektion mit 30 min warmer Ischämie. Angegeben sind Mittelwert  $\pm$  SEM.



#### 4.4. Zusammenfassung Projekt 4

- Keine Verbesserung des Überlebens nach 90%-iger Leberresektion durch vorherige MP- oder IP-Behandlung; sogar signifikant niedrigeres Überleben nach IP-Behandlung verglichen mit MP-Behandlungsgruppe
- Signifikant geringerer postischämischer Perfusionsausfall in 90%-resezierten Lebern verglichen zu nicht resezierten Lebern als Ausdruck eines Hyperperfusions-Syndroms in small-for-size Lebern
- Signifikant höhere portalvenöse, sinusoidale und venoläre Flußraten nach Resektion bzw. Reperfusion nach vorheriger IP-Behandlung verglichen zu unbehandelten Kontrollen als Ausdruck eines ausgeprägteren Hyperperfusions-Syndroms bei resezierten und IP-behandelten Lebern

## **E. Diskussion**

### **1. pharmakologische Präkonditionierung mit Methylprednisolon (Protektion vor Ischämie/Reperfusionsschädigung, Wirkmechanismus)**

Erste Berichte zur Steroidprotektion bei warmer Leberischämie erfolgten Mitte der 70er Jahre. Santiago-Delpin et al. beschrieben 1975, daß eine Vorbehandlung der Leber mit Steroiden vor einer nachfolgenden Ischämie/Reperfusionsschädigung schützen kann. Ihre experimentellen Untersuchungen an Kaninchen konnten die Autoren mit klinischen Daten bestätigen [Santiago-Delpin 1975, Figueroa 1975]. Wenngleich die pathophysiologischen Hintergründe noch unklar waren, wurde in den nachfolgenden Jahren Kortison bereits routinemäßig bei traumatologischen Patienten mit einer operationspflichtigen Leberverletzung vor Durchführung eines Pringle-Manövers eingesetzt [Pachter 1979, Pachter 1992].

Dabei scheint die Leber nicht das einzige Organ zu sein, welches durch Steroide vor einer Ischämie/Reperfusionsschädigung geschützt werden kann. So zeigten Valen et al. auch am Herzen einen protektiven Effekt von Methylprednisolon auf. Ein Anstieg des koronaren Flows nach 30 min warmer Ischämie sowie eine vermehrte Aktivität der antioxidativen Systeme konnte in ischämisch geschädigten Myokardzellen nach vorheriger Steroidbehandlung gezeigt werden [Valen 2000]. Auch die Niere profitierte von einer Steroidapplikation vor Einsetzen der warmen Gewebshypoxie, wie in mehreren Arbeiten gezeigt wurde [Takahira 2001, Reutzel-Selke 2003].

Jüngere Untersuchungen zur Leberprotektion ergaben, daß die im Rahmen der Reperfusion erfolgte Ausschüttung von Zytokinen durch vorherige Steroidapplikation reduziert und damit die inflammatorische Antwort innerhalb der Ischämie/Reperfusionsschädigung erheblich gesenkt wird, so daß letztlich der hepatozelluläre Gewebsschaden geringer ausfiel [Shimada 1996, Barnes 1998, Yamashita 2001].

Insbesondere die postischämische Ausschüttung von Interleukin-6 war nach Steroidapplikation signifikant reduziert [Shimada 1996, Yamashita 2001]. Auch die Expression von IL-1 $\beta$  und TNF-alpha wurde gesenkt und trug damit zur Reduktion der Ischämie/Reperfusionsschädigung bei [Wang 2001]. Ein weiterer wichtiger Aspekt im Rahmen der Protektion scheint die Suppression der Calpain  $\mu$  Aktivierung zu sein, die direkt protektiv auf das Zytoskelett der Zelle wirkt [Wang 2001]. Da die pathophysiologischen Mechanismen, die zur Protektion führen, noch nicht ausreichend analysiert sind, haben wir den Einfluß von Steroiden auf den hepatischen Ischämie/Reperfusionsschaden nach warmer Leberischämie im Rattenmodell untersucht.

In der Tat erwies sich dabei die Vorbehandlung mit Methylprednisolon auch in unseren Versuchen als außerordentlich effektiv im Sinne einer Reduktion des hepatischen Ischämie/Reperfusionsschadens. Die Konditionierung der Leber durch Methylprednisolon vor 45 min warmer Leberischämie erbrachte eine statistisch signifikant geringere hepatozelluläre Schädigung innerhalb der ersten 24 h nach Reperfusion. Wir beobachteten, daß sowohl die zytosolischen als auch die mitochondrialen Enzymsystem der warmen Zellhypoxie besser Stand hielten, wie die geringere postischämische Ausschüttung der Serumkonzentrationen von AST, ALT und GLDH anzeigte. Darüberhinaus ergab auch die histologische Aufarbeitung eine statistisch signifikant geringere morphologische Leberzellschädigung nach Steroidvorbehandlung als bei unbehandelten, ischämischen Kontrollen.

Auf der Suche nach den pathophysiologischen Grundlagen für den steroidbedingten Zellschutz führten wir Untersuchungen zu Inflammation und Apoptose durch. Obwohl bekannt ist, daß gerade Steroide anti-inflammatorische Eigenschaften aufweisen, ist die exakte Wirkweise noch nicht gänzlich aufgedeckt, insbesondere mit Blick auf die Prävention des Ischämie/Reperfusionsschadens, welcher durch eine ausgeprägte inflammatorische Komponente gekennzeichnet ist.

Bei den gegenwärtigen Vorstellungen zur Pharmakodynamik von Glukokortikoiden wird beschrieben, dass der entzündungshemmende Effekt von Glukokortikoiden u.a. durch eine verminderte Synthese von Entzündungsmediatoren (Interleukinen) bedingt ist [Barnes 1998]. Glukokortikoide haben einen zytoplasmatischen Rezeptor, der im inaktivierten Zustand zu einem Proteinkomplex mit einem Heat shock Protein (HSP-90) zusammengefasst ist. Aufgrund der lipophilen Eigenschaft und des geringen Molekulargewichts diffundieren exogen applizierte Glukokortikoide schnell durch die Zellmembran und können intrazellulär an den zytosolischen Glukokortikoidrezeptor binden. Durch Bindung des Glukokortikoids an diesen Rezeptor erfährt letzterer eine Konformationsänderung und stößt das Heat shock Protein ab. Infolge dieser Konformationsänderung kann der Glukokortikoid-Glukokortikoidrezeptor-Komplex in den Zellkern wandern und eine Änderung der Transkriptionsrate von Glukokortikoid-sensitiven Genen bewirken. Zu diesen Genen gehören IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-11, IL-12, IL-16, IFN- $\gamma$ , und TNF $\alpha$ . Weiterhin kann es auch zu einer direkten Beeinflussung des nukleären Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B und des Aktivatorprotein-1 (AP-1) kommen, die bei der Regulierung von inflammatorischen Genen eine wesentliche Rolle spielen. Dies betrifft vor allem die Regulation der Expression von IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-6, IL-11 und TNF $\alpha$ . Die Wirkung von Glukokortikoiden auf Adhäsionsmoleküle scheint hingegen indirekt über Steuerung der Expression von IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  erfolgen, während bei ICAM-1 und E-Selectin eine direkte Beeinflussung der Transkriptionsrate vorzuliegen scheint [Barnes 1998, Almawi 2002].

Auch wir sahen in unseren Versuchen, daß die Aktivität des nukleären Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B nach Steroidvorbehandlung deutlich reduziert war. Bei der Durchführung der Electro Mobility Shift Analyse (EMSA) zeigte sich in der Ischämiegruppe unmittelbar nach der 45-minütigen Ischämie ein Expressionspeak von NF $\kappa$ B, welches sich auf eine konstante Expressivität über einen Zeitraum von 24 h einstellte. Die Steroidgruppe hingegen zeigte einen Expressionspeak erst zum Zeitpunkt 24 h nach Reperfusion, während

bei früher Messung Methylprednisolon noch eine starke Unterdrückung der NF $\kappa$ B Aktivität bewirkte.

Analog hierzu sahen wir in unseren Experimenten eine deutliche Reduktion der Expression von ICAM-1 mRNA in postischämischen Lebergewebe innerhalb der ersten 6 h nach Reperfusion verglichen mit unbehandelten, ischämischen Kontrollen. Auch wenn wir nicht die Aktivität von I $\kappa$ B gemessen haben, so halten wir diesen Zusammenhang doch für kausal. Unterstützung erhält unsere Vermutung durch die Studie von Ito et al. und Suzuki et al., die die Wirksamkeit von Steroiden in der postischämischen Lunge bzw. in pulmonalen Endothelien untersuchten [Ito 2003, Suzuki 2000]. Auch sie wiesen nach Steroidgabe eine Reduktion der inflammatorischen Vorgänge sowie eine Suppression der Expression von ICAM-1 und VCAM-1 nach.

Zusammenfassend suppressierte Methylprednisolon in unseren Versuchen die postischämische inflammatorische Antwort im Rahmen der Ischämie/Reperfusionsschädigung durch Suppression der nukleären Transkriptionsfaktoren und der jeweiligen abhängigen Gene, hier am Beispiel von NF $\kappa$ B und ICAM-1 aufgezeigt. Des weiteren beobachteten wir aber noch einen zweiten Effekt der Steroidapplikation auf die inflammatorische Antwort. Interessanterweise sahen wir unmittelbar nach Reperfusion eine statistisch signifikant geringere Infiltration von inflammatorischen Zellen in die Leber. Dieses Resultat erbrachte die Auszählung des inflammatorischen Zellinfiltrates und die Analyse der Myeloperoxidase. Wenngleich die Messung der MPO-Spiegel in der Leber eine häufig angewandte Methode ist, wird die Interpretation der Ergebnisse von einigen Autoren als problematisch gewertet. Untersuchungen von Ormrod et al. beschreiben eine sehr schnelle und vollständige Inaktivierung der MPO im Leber-, Nieren- und Milzgewebe binnen 30 sec, während das Muskelgewebe nur gering und die Haut überhaupt nicht betroffen waren [Ormrod 1987]. Die Ursache der beobachteten Inaktivierung scheint in der Pseudo-Peroxidase-Wirkung des Hämoglobins zu liegen, welches in der Leber in großen Mengen vorhanden ist [Jaeschke

1991]. Daher sollten erhobene MPO-Daten nie alleinig gewertet werden. Im Zusammenhang mit der Auswertung der histologischen Schnitte jedoch sahen wir eine Übereinstimmung der Ergebnisse, so daß wir von einem steroidabhängigen Effekt ausgehen. Unseres Erachtens scheint Methylprednisolon dabei zusätzlich über eine Hemmung der Chemotaxis bereits unmittelbar nach Reperfusion das Ausmaß der postischämischen Infiltration von Leukozyten und neutrophilen Granulozyten nachhaltig zu beeinflussen und erfolgreich zu reduzieren.

Zur Darstellung der postischämischen apoptotischen Vorgänge im Rahmen der hepatischen Ischämie/Reperfusionsschädigung wählten wir die Darstellung der Expression von Caspase 3 Protein und Cytochrom C mRNA. Um die Ergebnisse zu verifizieren, führten wir zusätzlich eine immunhistochemische Auswertung (TUNEL Färbung) durch. In unseren Ergebnissen konnten wir nachweisen, dass die Steroidvorbehandlung die Apoptosevorgänge der Zelle nach Reperfusion stark beeinflusst. Während die Caspase 3 Aktivität eine weitgehend gleichbleibende Expression in der Ischämiegruppe über einen Zeitraum von 24 h aufwies, sahen wir bei Methylprednisolon behandelten Tieren eine Reduktion der Proteinexpression bereits zu frühen Zeitpunkten nach Reperfusion. In der Darstellung von Cytochrom C mRNA konnten wir in der Frühphase nach Reperfusion keine Unterschiede nachweisen, wohingegen 6 h nach Reperfusion eine weiterhin geringe mRNA Expression als Zeichen der Expressionsunterdrückung in der Steroidgruppe bestand. Die immunhistochemische Auswertung mittels TUNEL Färbung ergab eine signifikante Abnahme der apoptotischen Zellen durch Steroidvorbehandlung 3, 6 und 24 h nach Reperfusion verglichen mit unbehandelten, ischämischen Kontrollen.

Analog der reduzierten Expression inflammatorischer Gene wäre folglich auch eine Reduktion apoptotischer Gene durch steroidbedingte Unterdrückung nukleärer Transkriptionsfaktoren (wie z.B. NF $\kappa$ B) denkbar. Bisher konnte für die Leber jedoch kein solcher Zusammenhang gezeigt werden. Dabei ist der genaue Zusammenhang zwischen steroidbedingter Apoptoseunterdrückung und NF $\kappa$ B Aktivität jedoch noch unklar. So wurde

beschrieben, daß Glukokortikoide die Apoptose von Fibroblasten sowohl bei normaler wie auch bei reduzierter NF $\kappa$ B Aktivität verhinderten [Costas 2000]. In ähnlicher Weise war die TNF-induzierte Apoptose von ovariellen Granulosazellen nach Glukokortikoidgabe reduziert, jedoch ohne dass eine NF $\kappa$ B Aktivitätsänderung beobachtet wurde [Amsterdam 2002]. Umgekehrt hingegen war durch Aktivierung von NF $\kappa$ B die Apoptose in Hepatoma Zelllinien inhibiert [Evans-Storms 2000].

Dass Glukokortikoide apoptotische Vorgänge beeinflussen, ist mittlerweile nachgewiesen worden. So sind Glukokortikoide vor allem in Hepatozyten, Fibroblasten, Ovarzellen und Milchdrüsenzellen anti-apoptotisch wirksam, wohingegen in Thymozyten sowie B und T Lymphozyten Apoptose durch Steroide induziert wird [Amsterdam 2002]. In der Tat gibt es in der Literatur zahlreiche Hinweise, dass Steroide sowohl pro- als auch anti-apoptotisch wirksam sein können. Dieser Effekt scheint jedoch von Zelllinie zu Zelllinie bzw. Organ zu Organ unterschiedlich zu sein [Amsterdam 2002].

Im Rahmen von Organischämie und -reperfusion sind Steroide in Bezug auf ihre Bedeutung für die postischämische Apoptoseaktivität in der Leber noch nicht hinreichend untersucht worden. In Analogie zu unserer Studie zeigten Pearl et al. bei neonatalen Schweinen mit Myokardischämie nach Gabe von 60 mg/kg KG Methylprednisolon eine signifikante Reduktion der postischämischen Caspase 3 Aktivität und der apoptosepositiven Zellen in der TUNEL Färbung [Pearl 2002], was die Ergebnisse unserer Untersuchungen bestätigte. Andererseits zeigten Motoyama et al. an isoliert perfundierten Lebern, daß infolge von Steroidapplikation wohl der Ischämie/Reperfusionsschaden geringer ausfiel verglichen mit den Kontrollen. Diese Beobachtung ging jedoch nicht mit einer Reduktion der postischämischen Apoptose-Aktivität einher [Motoyama 2003]. Daher sollten weitere Untersuchungen zu diesem Aspekt erfolgen, um das Zusammenspiel von Glukokortikoiden und apoptotischen Vorgängen im Rahmen der Ischämie/Reperfusionsschädigung in der Leber zu beleuchten.

Zusammenfassend beobachteten wir eine deutliche Reduktion des hepatischen Ischämie/Reperfusionsschadens durch MP-Vorbehandlung. Diese war gekennzeichnet durch eine Reduktion der inflammatorischen und apoptotischen Vorgänge nach Reperfusion, die assoziiert waren mit einer Inhibition der Aktivität des nukleären Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B.



---

## **2. Methylprednisolon im Resektionsmodell (Protektion vor Ischämie/Reperfusionsschädigung, Regenerationskinetik)**

Die bisherigen Untersuchungen zur Pharmakodynamik von Methylprednisolon hinsichtlich der Protektion vor Ischämie/Reperfusionsschädigung wurden an einer kompletten Leber erhoben. Da dieses Modell nicht der chirurgischen Realität entspricht, wurden im nächsten Schritt die bisherigen Erkenntnisse in einem klinisch relevanten Modell überprüft. Hierzu führten wir während einer warmen Leberischämie von 30 min eine partielle Hepatektomie (70%) an der Ratte durch und untersuchten das Ausmaß der Steroid vermittelten Protektion vor Ischämie/Reperfusionsschädigung in dem verbleibenden Leberparenchym.

Aufgrund der bisherigen Analysen bestimmten wir 6 h nach Resektion bzw. Reperfusion die Serumkonzentrationen von AST, ALT und GLDH, da zu diesem Zeitpunkt das Maximum der postischämischen Enzymausschüttung messbar war [Glanemann 2004]. Sämtliche Parameter waren dabei statistisch signifikant niedriger als in ischämischen, unbehandelten Kontrollen, die ebenfalls eine 70%-ige partielle Hepatektomie erhalten hatten. Es bestätigte sich also die Annahme, daß eine Steroidvorbehandlung vor warmer Leberischämie die konsekutive Ischämie/Reperfusionsschädigung signifikant zu reduzieren vermag.

Von großem Interesse war im folgenden die Regenerationskinetik des verbleibenden Leberparenchyms. Analog der Hypothese, daß bei geringerer Ischämie/Reperfusionsschädigung die proliferativen Vorgänge im Rahmen der postoperativen Leberregeneration schneller und effizienter ablaufen, untersuchten wir im weiteren Verlauf die Regenerationsparameter Cyclin D 1, Mitose Index und Ki-67 Expression an den postoperativen Tagen 1, 4 und 7.

Wir stellten dabei fest, daß alle Steroid behandelten Tiere sich annähernd schnell von dem Eingriff erholten und gleichermaßen an Körpergewicht zunahmen wie unbehandelte,

ischämische Resektionskontrollen. Sowohl die Anzahl der Mitosen als auch der Ki-67 positiven Hepatozyten, wie auch die Expression von Cyclin D 1 zeigten keinerlei Unterschiede zwischen beiden Gruppen. Insgesamt gesehen war nach initial starker Proliferationsaktivität die Leberregeneration bereits zum vierten postoperativen Tag nahezu vollständig abgeschlossen. Lediglich die Synthese von Albumin war an Tag 4 nach Resektion in Steroid behandelten Tieren eingeschränkt, wohingegen der Vergleich der Bilirubinserumspiegel keinen Anhalt für eine postoperative Leberfunktionsstörung ergab. Somit verlief die hepatozelluläre Regeneration trotz Reduktion des hepatischen Ischämie/Reperfusionsschadens nicht schneller aber doch mit einer vergleichbaren Kinetik zu unbehandelten, ischämischen Kontrolltieren.

Neben den anti-inflammatorischen Eigenschaften haben Glukokortikoide bekannter Maßen auch anti-proliferative Eigenschaften [Almawi 2002], so daß eine Suppression der postoperativen hepatozellulären Proliferation zu befürchten gewesen wäre. In mehreren Arbeiten wurde nachgewiesen, daß Steroide die postoperative Expression von TNF und IL-6 supprimieren [Shimada 1996, Nagy 1996, Fujioka 2001, Yamashita 2001, Muratore 2003]. Dabei kommt im Rahmen der Regeneration aber gerade dem Zytokin IL-6 große Bedeutung zu, da es ein für die hepatozelluläre Proliferation zentrales Signal darstellt [Streetz 2000]. Es beeinflusst positiv die Leberzellregeneration [Camargo 1997], indem es die Sensivität und das Ansprechverhalten der Hepatozyten auf hepatotrope Wachstumsfaktoren wie z. B. hepatocyte growth factor (HGF) erhöht und damit die verbleibenden Hepatozyten zur Teilung sensibilisiert [Fausto 2000, Streetz 2000, Magnall 2003].

Verschiedene Arbeitsgruppen (Nagy et al., Nadal et al., Kim et al.) zeigten, daß die Leberregeneration unter Glukokortikoideinfluß in der Tat eine Suppression der hepatozellulären Proliferationsrate aufwies [Kim 1988, Nadal 1995, Nagy 1996]. Das Versuchsprotokoll in diesen Arbeiten beinhaltete keine warme Leberischämie, jedoch unterschiedliche Glukokortikoide im Rattenmodell. Unter Dexamethason-Behandlung war die

Expression von IL-6 und die postoperative Leberregeneration deutlich supprimiert [Nagy 1996]. Nach Hydrokortison- [Nadal 1995] und Methylprednisolon-Behandlung [Kim 1988] wurde jeweils eine reduzierte Leberzellproliferation gemessen, ohne daß jedoch die postoperative IL-6 Expression bestimmt wurde.

Eine genaue Betrachtung der vorliegenden Literatur scheint jedoch einen dosisabhängigen Effekt der Steroide auf die Regenerationsaktivität erkennen zu lassen. So war bei niedrigen Dosen von Hydrokortison (1,25 versus 6,25 mg/kgKG) [Nadal 1995] bzw. Methylprednisolon (1 bzw. 3 versus 8 mg/kgKG) [Azzarone 1992, Fujioka 2001] die postoperative Proliferationsrate sogar erhöht oder zumindest unbeeinträchtigt im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen.

Bei Durchführung einer Resektion mit warmer Leberischämie, wie in unseren Ergebnissen dargestellt, war die postoperative Leberzellregeneration unbeeinträchtigt, obwohl wir mit 30 mg/kgKG Methylprednisolon eine hohe Steroiddosis applizierten, die eine beeinträchtigte Proliferationsrate hätte erwarten lassen. Den Erhalt der normalen Regenerationskapazität führten wir aber auf eine Verbesserung der hepatozellulären Funktion durch eine Steroidbedingte Reduktion des Ischämie/Reperfusionsschaden zurück, so daß letztlich mehr intakte Hepatozyten vorhanden waren, die in den Prozeß der Mitose und Proliferation eintreten konnten.

Ob wiederum geringere Dosen von Methylprednisolon auch ausreichen würden, um die Ischämie/Reperfusionsschädigung zu reduzieren und möglicherweise zusätzlich noch eine Erhöhung der Proliferationsrate zu bewirken, ist ein interessanter Gesichtspunkt, der in weiteren Studien evaluiert werden sollte. Zumindest jedoch wäre der routinemäßige Einsatz von Steroiden auch bei Resektionen zu erwägen, in denen keine transiente Organischämie durchgeführt werden muß; dann jedoch sicherlich nicht in der ursprünglichen, zur Protektion vor Ischämie/Reperfusionsschäden empfohlenen Dosierung [Santiago-Delpin 1975], sondern deutlich niedriger dosiert. Auch wäre es denkbar, mit einer geringen Steroiddosis zur

Leberresektion zu beginnen, und im Falle eines im weiteren Verlauf notwendig werdenden Pringle-Manövers die Steroiddosis durch erneute Bolusgabe zu erhöhen.

---

### **3. Ischämische Präkonditionierung (IP-Zeitintervall, Protektion vor Ischämie/Reperfusionsschädigung, Wirkmechanismus)**

Die von Murry et al. erstmals beschriebene ischämische Präkonditionierung ist charakterisiert durch eine oder mehrere kurze Phasen der Hypoxie, gefolgt von einer Reperusionsphase vor der eigentlichen, länger andauernden Organischämie [Murry 1986]. Mittlerweile konnten viele Arbeitsgruppen die Wirksamkeit der IP-Vorbehandlung zur Minderung des postischämischen Organschadens darstellen. Dies gelang sowohl an verschiedenen Organen, als auch an verschiedenen Spezies [Schott 1990, Lloris-Carsi 1993, Kume 1996, Ishida 1997, Korthuis 1998, Hawaleshka 1998].

Trotz aller bisherigen Untersuchungen sind einige Fragen zur IP noch unbeantwortet. Speziell für die Leberchirurgie gibt es keine befriedigenden Aussagen über die genaue Durchführung der IP. So ist neben den zugrundeliegenden pathophysiologischen Vorgängen noch unklar, mit welchen Zeitsequenzen die IP-Vorbehandlung durchgeführt werden sollte. In der Literatur gibt es bezüglich der IP-Zeitintervalle unterschiedliche Protokolle. In experimentellen Studien von Hardy et al., in denen eine 80 – 85%ige Leberteilesektion bei Ratten durchgeführt wurde, konnte gezeigt werden, daß die Wirksamkeit der IP ein zeitabhängiges Phänomen darstellt [Hardy 1996]. Eine 3-minütige Ischämie mit einer nachfolgenden Reperusionszeit von 5 min konnte keinen Schutz vor einer konsekutiv ausgeführten Ischämie bewirken. Mit dem Zeitintervall von 5/10 min hingegen wurde eine signifikante Protektion der Leber erzielt. Das Überleben der Versuchstiere 24 h nach dem operativen Eingriff stieg dabei von 10% auf 90% an [Hardy 1996]. Clavien et al. wiederum identifizierten bei Mäusen eine maximale Protektion der Leber vor Ischämie/Reperusionsschädigung mit einem IP-Zeitintervall von 10/15 min [Yadav 1999]. Peralta et al. hingegen favorisierten ein 10/10-minütiges Zeitintervall für ihre Untersuchungen zur IP-Behandlung bei der Leber [Peralta 1996].

Das Ziel der vorliegenden Untersuchungen zur IP-Protektion war es, zunächst ein optimales IP-Zeitprotokoll zu bestimmen. Da die AST und ALT am besten mit dem Grad der ischämischen Schädigung korrelieren [Iu 1987], wurden systematisch verschiedene IP-Zeitprotokolle hinsichtlich der Intensität der hepatozellulären Protektion untersucht und das Ausmaß der Protektion anhand der Höhe der freigesetzten Serumenzyme beurteilt. Wir führten eine 45-minütige warme Leberischämie durch Abklemmen des Ligamentum hepatoduodenale (Pringle-Manöver) durch und bestimmten 24 h nach Reperfusion die Serumkonzentrationen von AST, ALT und GLDH.

Dabei zeigte sich, daß für die IP-Zeitintervalle bestehend aus einer Ischämiezeit von 5 min mit anschließender Reperfusionszeit von 5 bis 45 min die Zellschädigungsparameter mit steigender Reperfusionszeit abnahmen. Ab einer Reperfusionszeit von 30 min gab es eine statistisch signifikante Reduktion aller erhobenen Parameter. Für das IP-Zeitintervall 15/30 min zeigte sich ebenfalls eine signifikante Reduktion aller Parameter, während das IP-Intervall 10/10 min nur partiell eine signifikante Reduktion der Schädigungsparameter erzielen konnte.

Für die folgenden Versuchsreihen wurde daher das Zeitintervall 5/30 min als optimales IP-Zeitprotokoll aus vornehmlich drei Gründen gewählt. Zum einen genügten 5 min Ischämie, um einen signifikanten Leberzellschaden zu induzieren. Zum zweiten beobachteten wir, daß je länger die Reperfusionsphase andauerte, desto geringer die Schädigungsparameter ausfielen. Wir postulieren, daß eine gewisse Zeitspanne erforderlich ist, um protektive Mechanismen zu initiieren und sich entwickeln zu lassen. Drittens, die Verlängerung der Reperfusionsdauer von 5/30 auf 5/45 min erbrachte keine weitere signifikante Senkung der Schädigungsparameter, sondern bedeutete lediglich eine Verlängerung der totalen Operationszeit.

In Anbetracht einer frühzeitig vermittelten IP-vermittelten Gewebssprotektion, wie sie von Korthuis et al. beschrieben und als “acute preconditioning“ bezeichnet wird [Korthuis 1998],

föhrten wir im nächsten Schritt Untersuchungen durch, die den Einfluß der IP auf den Ischämie/Reperfusionsschaden der Leber innerhalb der ersten 24 h nach Reperfusion aufzeigen sollten.

In der Tat schützte die IP-Vorbehandlung (mit 5/30 min als IP-Zeitprotokoll) uerst effektiv vor einer hepatozellulären Ischämie/Reperfusionsschädigung gemessen an der postischämischen Ausschüttung der Serumenzyme AST, ALT und GLDH, die statistisch signifikant reduziert waren verglichen mit unbehandelten, ischämischen Kontrollen. Auch die histologische Gewebsanalyse bestätigte die geringere histomorphologische Schädigung in den Lebern IP-behandelter Tiere. Im Vergleich zu Steroid behandelten Tieren machten wir die Beobachtung, daß eine Vorbehandlung der Leber mit IP effektiver die Ausschüttung leberspezifischer Enzyme nach Reperfusion verhinderte, auf histomorphologischer Ebene jedoch beide Behandlungsstrategien eine gleichermaßen ausgeprägte und effektive Gewebsschutzprotektion erzielten.

Im weiteren Verlauf stand im Zentrum der Analysen die Identifizierung möglicher Schutzmechanismen. In diesem Kontext zu sehen sind unseres Erachtens vor allem schnell wirkende Prozesse, die an einer frühen Schutzausbildung beteiligt sein könnten, während die Induktion von sogenannten Heat shock Proteinen oder antioxidativen Enzymen in diesem Zusammenhang eine eher untergeordnete Rolle spielen. Immerhin sahen wir bereits innerhalb der ersten 3 bis 6 h nach Reperfusion deutliche Unterschiede zwischen IP-behandelten und unbehandelten Tieren, zu einem Zeitpunkt also, der nicht dem sogenannten “delayed preconditioning“ zugeordnet wird, wo vor allem der Überexpression von HSP-70, HSP-72 oder antioxidativen Enzymen eine besondere Bedeutung im Rahmen der IP-vermittelten Protektion zugesprochen werden [Korthuis 1998].

Insgesamt betrachtet sind bereits eine Vielzahl von Mechanismen und Faktoren diskutiert und untersucht worden, der genau zugrunde liegende Schutzmechanismus der Protektion ist aber immer noch nicht identifiziert [Korthuis 1998, Hawaleshka 1998, Teoh 2003]. Unser

Augenmerk richteten wir deshalb gezielt auf die Untersuchung der hepatischen Mikrozirkulation sowie auf inflammatorische und apoptotische Vorgänge.

Die Expression der apoptotischen Marker Cytochrom C mRNA und Caspase 3 Protein war nach IP-Behandlung in keiner Weise beeinträchtigt und zeigte die gleiche Aktivität wie bei unbehandelten, ischämischen Kontrolltieren. Ähnliches galt für die Expression von ICAM-1 mRNA. Analog hierzu zeigte sich die Aktivität des nukleären Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B ebenfalls nicht supprimiert nach IP-Behandlung, sondern wies bereits zum Zeitpunkt 0 h nach Reperfusion ein Expressionsmaximum auf. Dies werteten wir als unmittelbare Reaktion auf die 5-minütige Ischämie im Rahmen der IP-Vorbehandlung, wie es bereits bei Untersuchungen zur Dünndarmischämie beschrieben worden ist [Yeh 2000].

Im Gegensatz zur Steroidvorbehandlung hatte die IP-Vorbehandlung somit keinerlei Auswirkung auf den Aktivitätsgrad des nukleären Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B und der damit assoziierten Expression apoptotischer und inflammatorischer Gene. Dennoch war unmittelbar nach Reperfusion die Anzahl inflammatorischer Zellen sowie der Myeloperoxidasegehalt der Leber als Maß der neutrophilen Infiltration bei IP-behandelten Tieren signifikant reduziert verglichen zu unbehandelten, ischämischen Kontrollen. Außerdem sahen wir signifikant weniger TUNEL positive Zellen in den immunhistologischen Gewebsschnitten nach IP-Vorbehandlung, was der signifikant reduzierten histomorphologischen Schädigung entsprach.

Als Grund für die geringere hepatozelluläre Ischämie/Reperfusionsschädigung inklusive der geringeren Apoptose und frühen inflammatorischen Gewebsinfiltration nach IP-Behandlung nahmen wir in unseren Untersuchungen eine Verbesserung der Mikrozirkulation der postischämischen Leber an. Anhand von in vivo Analysen zur Mikroperfusion konnten wir zeigen, daß es zu einer signifikant verbesserten sinusoidalen Perfusion bei IP-behandelten Tieren kam. Dabei war das Ausmaß der Mikrozirkulationsstörung sowohl 30 als auch 90 min nach Reperfusion signifikant niedriger als bei unbehandelten, ischämischen Kontrolltieren. 30



min nach Ischämie waren 75 % aller Sinusoide in der IP-Gruppe perfundiert gegenüber weniger als 30 % aller Sinusoide in der Kontrollgruppe. 90 min nach Reperfusion war die Perfusion nur noch in knapp 24 % der Sinusoide in der Kontrollgruppe vorhanden, während nach IP-Behandlung noch 67 % aller Sinusoide offen und frei perfundiert waren. Ebenfalls sahen wir eine signifikant bessere Sauerstoffversorgung der Leberzelle bis hin zum mitochondrialen Zellsystem, wie die Messung der NADH Fluoreszenz an der Leberparenchymoberfläche belegte.

Demnach scheint die IP-Vorbehandlung eine verbesserte sinusoidale Perfusion zu bewirken, die wiederum eine verbesserte Oxygenierung der Zelle nach sich zieht. Dies dürfte einerseits die verminderte Anzahl TUNEL positiver Zellen, die geringere histomorphologische hepatozelluläre Schädigung und sekundär den höheren Gallefluß als Zeichen einer verbesserten hepatozellulären Funktion nach IP-Behandlung erklären.

Der Erhalt der postischämischen Mikroperfusion scheint damit einen wesentlichen Baustein bei der IP-vermittelten Gewebsschutz darzustellen. Diese Annahme bestätigten Studien von Zapletal et al., Nilsson et al. und Vajdova et al., die ebenfalls eine signifikante Verbesserung der hepatischen Mikroperfusion und einen geringeren Ischämie/Reperfusionsschaden der Leber durch IP-Behandlung sahen [Zapletal 1999, Nilsson 2000, Vajdova 2004].

Dabei scheinen insbesondere sinusoidale Endothelzellen von einer IP-Vorbehandlung zu profitieren. Während Arai et al. zeigten, daß IP-Vorbehandlung den postischämischen Schaden an sinusoidalen Endothelzellen signifikant reduzierte [Arai 2000], kamen Yadav et al. zu einem ähnlichen Ergebnis, in dem auch sie beschrieben, daß die Apoptose von ischämisch geschädigten sinusoidalen Endothelzellen gemindert wird, während Kupffer-Zellen keine Beeinträchtigung der postischämischen Apoptoseaktivität aufwiesen [Yadav 1999]. Aus derselben Arbeitsgruppe stammte eine Untersuchung zur postischämischen Mikrozirkulation, die neben einer verbesserten sinusoidalen Perfusion auch den Erhalt der sinusoidalen

Zellwand sowie eine geringere Leukozyten-Endothelzell Interaktion nach IP-Vorbehandlung beschrieb [Vajdova 2004]. Möglicherweise wird durch Erhalt der sinusoidalen Endothelzellintegrität das Ausmaß der postischämischen Leukozyten-Endothelzell Interaktion reduziert, was auf endoluminaler Seite zu einer Verbesserung der sinusoidalen Perfusion führt. In diesem Zusammenhang beschrieben Arai et al. sogar, daß eine unilobäre IP-Vorbehandlung die Leukozyten-Endothelzell Interaktion in beiden Leberhälften, d.h auch in der nicht präkonditionierten Leberhälfte, signifikant reduzierte und damit einen geringeren Ischämie/Reperfusionsschaden der gesamten Leber zur Folge hatte. Dieses Phänomen bezeichneten sie als heterologe Präkonditionierung [Arai 2001].

Es stellt sich im Anschluß die Frage, über welche Signale oder Mediatoren diese Form der Protektion vermittelt wird. Peralta et al. diskutierten in diesem Zusammenhang eine durch nitric oxide (NO) vermittelte Inhibition des vasokonstriktorisches wirkenden Endothelins [Peralta 1996]. NO wurde identifiziert als Endothelial derived relating Factor (EDRF), welcher einem potenten Vasorelaxanz entspricht [Furchtgott 1980]. NO wird gebildet in vaskulären Endothelzellen, einerseits durch die konstitutive NO Synthase-1 als auch durch die induzierbare NO Synthase-2 [Nussler 1993, Nussler 1995]. Demnach wurde beschrieben, daß sowohl durch direkte NO-Wirkung als auch indirekt durch Inhibition des vasokonstriktorisches wirkenden Endothelins eine verstärkte Vasodilatation nach IP-Behandlung resultierte [Peralta 1996].

Als ein Hauptmediator der IP-vermittelten NO-Expression wurde dabei Adenosin identifiziert [Downey 1994, Peralta 1997, Peralta 1998, Ishida 1997]. Adenosin interagiert mit dem Adenosin A-1 Rezeptor, wodurch es zu einer G-Protein-gekoppelten Aktivierung der Phospholipase-C und Diacylglycerol kommt. Diese Moleküle führten zu einer Zunahme der Phosphokinase-C, was konsekutiv eine Zunahme von NO und zur „Down“-Regulation von P-Selektin bewirkte [Peralta 1997, Ishida 1997, Nakayama 1999, Peralta 2001, Carini 2001].

Inwiefern der Energiehaushalt der Zelle im Rahmen der IP-vermittelten Protektion eine primäre Rolle zur Verbesserung der Mikrozirkulation einnimmt [Peralta 2000, Peralta 2001], oder ob erhöhte Spiegel von zyklischem AMP sekundär, d.h. als Folge einer verbesserten Zelloxygenierung bzw. -perfusion zu werten sind, ist gegenwärtig schwer zu beurteilen [Teoh 2003]. Ebenfalls wird von einigen Autoren die Reduktion der postischämischen Apoptose als Hauptmechanismus der IP-vermittelten Protektion angesehen [Ishii 2001, Rüdiger 2002]. In Analogie zum zellulären Energiehaushalt wäre es aber durchaus möglich, daß dies sekundäre Folgeerscheinung einer verbesserten zellulären Oxygenierung im Rahmen der verbesserten Organperfusion darstellen.

Zahlreiche Arbeiten haben hinreichend belegt, daß die Ischämie/Reperfusionsschädigung wesentlich durch die leukozytäre Gewebeeinfiltration und Zellinteraktion mitbestimmt wird [Granger 1995, Martinez-Mier 2000, Lentsch 2000]. Jaeschke et al. konnten anhand histologischer Analysen eine massive lymphozytäre Infiltration ins postischämische Leberparenchym nachweisen [Jaeschke 1997]. Diese korrelierte mit der Entwicklung einer Leberzellschädigung sowie der Zunahme der histologisch erkennbaren zellulären Nekrosen. Die Annahme, daß eine Mitwirkung von Leukozyten an der hepatischen Ischämie/Reperfusionsschädigung beteiligt ist, wurde unterstützt durch Studien, die zeigten, daß eine Abnahme oder auch eine funktionelle Inaktivierung von neutrophilen Granulozyten zu einer verringerten Ischämie/Reperfusionsschädigung führte [Jaeschke 1993]. Bevor es zu einer transendothelialen Migration und zu einer Infiltration ins Gewebe kommt, müssen die Leukozyten mit dem vaskulären Endothel interagieren. Für die Interaktion zuständig sind spezifische Zelloberflächen-Rezeptoren. In einem kaskadenartigen Prozeß kommt es dabei zum Entlangrollen und zur Adhäsion von Leukozyten an das Endothel und schließlich zur Extravasation der Leukozyten ins Parenchym [Martinez-Mier 2000].

In unseren Untersuchungen konnten wir eine Zunahme sowohl der sinusoidal stagnierenden Leukozyten, als auch der postsinusoidal temporär adhären und

stagnierenden Leukozyten nach 30 und 90 min nach Reperfusion beobachten. Wir sahen jedoch keine Unterschiede zwischen IP-behandelten und unbehandelten, ischämischen Kontrolltieren. So bestätigte sich nicht die Annahme, daß es durch IP-Vorbehandlung zu einer Reduktion der leukozytären Adhärenz kommt [Sawaya 1999, Howell 2000]. Vielmehr halten wir ein Auswaschen der Leukozyten in der Frühphase nach Reperfusion durch Erhalt der postischämischen Leberperfusion für wahrscheinlich. Dies würde die verminderte leukozytäre und neutrophile Gewebsinfiltration zum frühen Zeitpunkt nach Reperfusion erklären. Wie lange der IP-vermittelte Perfusions‐vorteil‐ besteht, verbleibt unklar und ist anhand unserer Untersuchungen auch nicht zu eruieren. Es scheint unseres Erachtens dabei aber nicht die Dauer des IP-vermittelten Perfusionserhalts sondern vielmehr der Zeitpunkt das Ausmaß der hepatischen Ischämie/Reperfusionsschädigung zu determinieren. Demzufolge werden in der Frühphase nach Reperfusion bereits die Weichen für das Ausmaß der Organschädigung gestellt, die durch IP-Vorbehandlung deutlich gemindert werden könnte.

Die aufgezeigten Aspekte legen den Schluß nahe, daß es sich bei der IP-vermittelten Organprotektion um Adenosin- und NO-vermittelte Veränderungen handelt, die in der frühen Phase nach Reperfusion greifen und zu einer verbesserten postischämischen Durchblutung der Leber führen. Es resultiert eine deutliche Verbesserung der Oxygenierung der Hepatozyten und zellulären Enzymsysteme, so daß eine signifikant geringere Ischämie/Reperfusionsschädigung bzw. signifikant bessere postischämische Leberfunktion resultiert.

#### **4. Ischämische Präkonditionierung im Resektionsmodell** (Protektion vor Ischämie/Reperfusionsschädigung, Regenerationskinetik, Hyperperfusions-Syndrom)

Ischämische Präkonditionierung schützt die Leber effektiv vor warmer Ischämie/Reperfusionsschädigung durch Erhalt der sinusoidalen Perfusion. Mehrere Arbeiten haben unabhängig voneinander beschrieben, daß die Leber so vor einer schweren postischämischen Mikrozirkulationsstörung, die im schlimmsten Fall zu einem kompletten Funktionsverlust des Organs führen kann, bewahrt wird [Zapletal 1999, Nilsson 2000, Glanemann 2003, Vajdova 2004].

Eine adequate Leberzellfunktion ist Voraussetzung für proliferative Vorgänge nach Leberresektionen, die unter temporärer warmer Ischämie durchgeführt werden. So dürfte in Anbetracht einer verbesserten postischämischen Gewebsoxygenierung trotz stattgehabter Ischämie/Reperfusionsschädigung die Anzahl funktionstüchtiger Hepatozyten erhöht und theoretisch damit die postoperative Regeneration durch IP-Vorbehandlung positiv beeinflusst werden.

Hardy et al. führten im Rattenmodell eine 80 – 85%-ige Leberteileresektion mit gleichzeitiger warmer Leberischämie durch. Sie beobachteten, daß das Überleben der Versuchstiere 24 h nach dem operativen Eingriff durch IP-Vorbehandlung von 10% auf 90% anstieg [Hardy 1996]. Des weiteren beschrieben Teoh et al., daß sich ischämisch geschädigte Hepatozyten nach IP-Vorbehandlung in höherer Anzahl in einen proliferierenden Status wandelten, als ohne IP-Vorbehandlung [Teoh 2002]. Sie beobachteten bei IP behandelten Mäusen eine vermehrte Expression des nukleären Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B und des Proliferationsmarkers Cyclin D 1. Dabei wurden ihre Untersuchungen aber nicht in einem Resektionsmodell durchgeführt, sondern beschränkten sich auf komplette Lebern.

Dieses Kriterium mag die Unterschiede zu unseren Ergebnissen erklären. Ebenso war möglicherweise die Nachbetrachtungszeit von Hardy et al. (24 h) zu kurz, um definitiv einen Überlebensvorteil durch IP-Vorbehandlung zu dokumentieren.

In unseren Versuchen führten wir zunächst eine 70%-ige Leberresektion durch, die während einer warmen Ischämie von 30 min durch Abklemmen des Ligamentum hepatoduodenale (Pringle-Manöver) erzeugt wurde. Der hepatozelluläre Ischämie/Reperfusionsschaden wurde durch IP-Vorbehandlung signifikant gegenüber der unbehandelten, ischämischen Resektionskontrollen reduziert. Dies wurde durch eine signifikant geringere postischämische Ausschüttung der Serumkonzentrationen AST, ALT und GLDH 6 h nach Reperfusion deutlich.

Die hepatozelluläre Regeneration nach 70%-iger Leberresektion war jedoch nach IP-Behandlung nachhaltig eingeschränkt. Das Gewicht der regenerierenden Parenchymmasse war signifikant geringer an Tag 1 nach Resektion. Analog hierzu waren deutlich weniger Hepatozyten in Proliferation befindlich. Auch zeigte sich, anhand der Darstellung der erhöhten Serumkonzentrationen von AST und ALT, eine ausgesprochene Leberzellschädigung an Tag 1. Dennoch überlebten alle Tiere mit IP-Behandlung den gesamten Beobachtungszeitraum.

Insgesamt gesehen sahen wir trotz Reduktion des hepatischen Ischämie/Reperfusionsschadens keine Verbesserung der Proliferation nach IP-Vorbehandlung bei 70%-leberresezierten Tieren. Im Gegenteil, sämtliche Regenerationsmarker waren deutlich reduziert gegenüber unbehandelten, ischämischen Resektionskontrollen und gegenüber Steroidbehandelten Tieren. Diese Beobachtung geht einher mit den Ergebnissen von Ishii et al, die darlegten, daß IP einerseits den Ischämie/Reperfusionsschaden reduziert, andererseits aber die Expression von transkriptionellen Regulatorproteinen, sogenannte "immediate early genes", herunterregulierten [Ishii 2001]. Da im Rahmen der zellulären Proliferation die Expression dieser transkriptionellen Regulatorproteine aber hochreguliert

werden müsste, um zentrale Vorgänge der Leberzellregeneration zu induzieren [Fausto 1995, Fausto 2000, Court 2002], könnte die durch IP-Vorbehandlung hervorgerufene Herunterregulierung dieser “immediate early genes“ die von uns beobachtete, geringere hepatozelluläre Proliferation erklären.

Um zu überprüfen, warum die Verbesserung der Leberdurchblutung nach IP-Behandlung keinen positiven Effekt auf die Regeneration nach partieller Hepatektomie aufwies, dehnten wir das Ausmaß der Resektion auf 90% Leberresektion aus, da wir vermuteten, daß eine 70%-ige Resektion bei Ratten noch wohl toleriert wird und wir deshalb noch nicht in dem Grenzbereich waren, in dem protektive Vorgänge wie IP einen positiven Effekt aufweisen können.

Interessanterweise verstarben jedoch nach 90%-iger Leberresektion alle IP-behandelten Tiere innerhalb der ersten 3 Tage postoperativ, während unbehandelte und Steroid-behandelte Tiere ein 10-20%-iges Langzeitüberleben aufwiesen. Anhand der dargestellten Überlebenskurve wird deutlich, daß ein 24-stündiger Beobachtungszeitraum (wie bei Hardy et al.) nicht ausgereicht hätte, um eine sichere Aussage treffen zu können.

Wie nach IP-Behandlung zu erwarten, ergaben frühpostoperative Messungen zur portalen Leberperfusion eine signifikant höhere postischämische portalvenöse Flußrate verglichen mit Steroid behandelten und unbehandelten, ischämischen Resektionskontrollen. Im Rahmen der Untersuchungen mittels Intravitalmikroskopie sahen wir 30 min nach Resektion bzw. Reperfusion einen geringeren postischämischen Perfusionsausfall in den IP-behandelten Tieren als bei unbehandelten, ischämischen Resektionkontrollen. Hierbei waren nach 90%-iger Resektion und vorheriger IP-Behandlung noch  $95,1 \pm 1,6$  % aller Sinusoide perfundiert, bei unbehandelten Kontrolltieren waren es sogar noch  $91,3 \pm 2,4$  %. Dabei beobachteten wir, daß unabhängig von der Behandlungsgruppe (IP- oder unbehandelt) in den resezierten Lebern deutlich mehr offene und frei perfundierte Sinusoide als bei nicht resezierten, ischämisch geschädigten Lebern zu sehen waren. Bei letzteren betrug die Perfusionsrate 30 min nach

Reperfusion nur noch  $28,39 \pm 10,5$  % in der Kontrollgruppe bzw.  $75,59 \pm 7,5$  % in der IP-Gruppe.

Wir glauben, daß der nahezu vollständige Erhalt der Mikroperfusion nach ausgedehnter Resektion einen unphysiologischen Zustand darstellt. Da weiterhin das gesamte portalvenöse Blutvolumen die Leber erreicht, stellt dieser Zustand unseres Erachtens einen Status der relativen Hyperperfusion dar, die sich nachhaltig auf die zelluläre Regeneration auswirkt. Dabei könnte durch den erhöhten Blutfluss eine zusätzliche Ablösung von Endothelzellen die hepatozelluläre Schädigung erhöhen und die protektiven Effekte der IP-Vorbehandlung aufheben. Zwar kann über den sogenannten “hepatic artery buffer response“ der arterielle Blutstrom den tatsächlichen Perfusionsbedürfnissen angepasst werden [Richter 2001], doch nur etwa 1/3 der gesamten Blutversorgung der Leber erfolgt über die Leberarterie, während immerhin 2/3 des Blutvolumens aus der Pfortader die auf 10% des ursprünglichen Volumens reduzierte Leber erreichen.

Aus dem Bereich der split-Lebertransplantation ist bekannt, daß eine portalvenöse Hyperperfusion zu einem Anschwellen von Hepatozyten führt (sogenanntes “hepatocyte ballooning“) [Marcos 2000, Man 2001, Man 2003, Troisi 2003]. Ferner wurde in dieser Situation ein Verlust des Disse’schen Raums sowie eine Zunahme der Zwischenräume zwischen den sinusoidalen Endothelzellen als Ausdruck der Organschädigung beobachtet [Man 2003].

Demnach wird die für die Leber ohnehin schon fatale Hyperperfusion unseres Erachtens durch IP-Vorbehandlung noch verstärkt. So war die in vivo gemessene postischämische erythrozytäre Flußrate (velocity) sowohl in den Venolen wie auch in den Sinusoiden 30 min nach Reperfusion signifikant erhöht nach IP-Behandlung verglichen mit unbehandelten Kontrollen. Gleichsinnig hierzu ergab die Analyse der erythrozytären Flußrate bezogen auf den Gefäßdurchmesser (volumetric blood flow) signifikant höhere Flußraten bei IP-



behandelten Lebern, insbesondere wiederum in den Venolen, während in den Sinusoiden der volumetric blood flow noch tendentiell erhöht war.

Aus diesem Grund könnten die protektiven Effekte der IP-Vorbehandlung auf die Ischämie/Reperfusionsschädigung bei größenreduzierten Lebern aufgrund des assoziierten Hyperperfusionssyndroms aufgehoben sein. Dies würde auch erklären, warum bei Patienten, die eine Leberresektion von mehr als 50% erhielten, keine IP-vermittelte Organprotektion mehr nachweisbar war [Clavien 2003].

## **F. Zusammenfassung**

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Verfahren untersucht, die eine erfolgreiche Protektion vor hepatischer Ischämie/Reperfusionsschädigung versprachen: mechanische Konditionierung (ischämische Präkonditionierung) und pharmakologische Konditionierung (Methylprednisolon).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Ausmaß der hepatozellulären Schädigung nach 45-minütiger warmer Leberischämie durch Abklemmen der blutzuführenden Gefäße im Ligamentum hepatoduodenale (Pringle-Manöver) im zeitlichen Verlauf über 24 h nach Reperfusion untersucht. Bereits 3 h nach Reperfusion fand sich eine statistisch signifikante Reduktion der hepatozellulären Gewebsschädigung, sowohl nach MP- als auch nach IP-Behandlung. Insgesamt konnte durch beide Strategien eine vergleichbar starke Gewebsschutz erzielt werden. Sowohl die postischämischen Serumkonzentrationen von AST, ALT und GLDH wie auch die histologische Aufarbeitung ergaben eine statistisch signifikant geringere hepatozelluläre Ischämie/Reperfusionsschädigung innerhalb der ersten 24 h verglichen mit unbehandelten, ischämischen Kontrolltieren.

Bezüglich der möglichen zugrundeliegenden protektiven Mechanismen führten wir entsprechend des pharmakologischen Wirkprofils von Methylprednisolon Untersuchungen zu Apoptose und Inflammation durch. Unsere Ergebnisse zeigten eine Reduktion der postischämischen Apoptose-Aktivität an. Im Gegensatz zu IP-behandelten Tieren war die Aktivität apoptotischer Gene in MP-behandelten Lebern auf mRNA und Proteinebene nach Reperfusion deutlich reduziert. Sowohl die Expression von Cytochrom C mRNA als auch von Caspase 3 Protein war deutlich supprimiert gegenüber den Kontrolltieren. In Gegensatz dazu zeigten IP-behandelte Tiere nach der Reperfusion eine konstant erhöhte Expression beider Apoptose Marker an. Die Anzahl TUNEL positiver Zellen hingegen war in beiden

Behandlungsgruppen gleichermaßen signifikant gegenüber unbehandelten, ischämischen Kontrollen reduziert.

Die Auszählung des inflammatorischen Zellinfiltrates sowie die Analyse der Myeloperoxidase im Gewebe zeigte eine signifikant geringere inflammatorische Antwort in MP- und IP-behandelten Lebern an. Dieser Unterschied bestand unmittelbar nach Reperfusion (0 h) gegenüber den unbehandelten, ischämischen Kontrolltieren. Die Expression von ICAM-1 mRNA war innerhalb der ersten 6 h nach Reperfusion nach MP-Behandlung vollständig supprimiert, wohingegen IP-behandelte Lebern eine Expressionszunahme gegenüber unbehandelten Kontrollen aufwiesen.

Analog zur reduzierten Expression apoptotischer und inflammatorischer Gene nach MP-Behandlung fand sich auch auf transkriptioneller Ebene eine reduzierte Expression der NF $\kappa$ B Bindungsaktivität. Die verminderte NF $\kappa$ B Aktivität in MP-behandelten Lebern mit sekundär reduzierter Expression apoptotischer und inflammatorischer Gene lässt somit einen kausalen Zusammenhang bei der Protektion vor warmer Ischämie/Reperfusionsschädigung erkennen.

Im Gegensatz dazu war die geringere hepatozelluläre Ischämie/Reperfusionsschädigung nach IP-Behandlung durch eine verbesserte postischämische Mikrozirkulation bedingt. 30 min nach Ischämie waren 75 % aller Sinusoide in der IP-Gruppe perfundiert statt weniger als 30 % in der unbehandelten, ischämischen Kontrollgruppe. Hierbei beobachteten wir eine signifikant bessere Sauerstoffversorgung der Leberzelle bis hin zum mitochondrialen Zellsystem. Dies dürfte einerseits die verminderte Anzahl TUNEL positiver Zellen, die geringere histomorphologische hepatozelluläre Schädigung und sekundär den höheren Gallefluß als Zeichen einer verbesserten postischämischen Leberzellfunktion erklären.

Zur Umsetzung der erhobenen Ergebnisse in ein klinisch relevantes Modell führten wir eine 70%-ige partielle Hepatektomie mit IP- oder MP-Vorbehandlung durch. Die Leberresektionen wurde während einer 30-minütigen warmen Ischämie durch Unterbindung der Blutzufuhr mittels Pringle-Manöver durchgeführt.

Wie erwartet wurde der Ischämie/Reperfusionsschaden durch IP- bzw. MP-Behandlung dabei signifikant reduziert gegenüber den unbehandelten, ischämischen Kontrollen. Die Regeneration nach 70%-iger Leberresektion war jedoch nach IP-Behandlung nachhaltig eingeschränkt. Das Gewicht der regenerierenden Leber war signifikant geringer an Tag 1 nach Resektion. Analog hierzu waren deutlich weniger Hepatozyten in Proliferation befindlich. Im Gegensatz zur IP-Behandlung waren die regenerativen Vorgänge nach MP-Behandlung keinesfalls eingeschränkt. Dennoch verlief trotz Reduktion des Ischämie/Reperfusionsschadens die hepatozelluläre Regeneration nicht schneller, aber doch mit einer vergleichbaren Kinetik zu unbehandelten, ischämischen Kontrollen ab.

Um zu überprüfen, warum die Verbesserung der Leberdurchblutung nach IP-Behandlung keinen positiven Effekt auf die Regeneration nach partieller Hepatektomie aufwies, dehnten wir das Ausmaß der Resektion auf 90% Leberresektion aus, um in einen subletalen Bereich zu gelangen, in dem wir vermuteten, daß protektive Vorgänge einen positiven Effekt aufweisen müssten. Hier verstarben alle IP-behandelten Tiere innerhalb der ersten 3 Tage postoperativ, während MP-behandelte und unbehandelte, ischämische Kontrollen ein 10 - 20%-iges Langzeitüberleben aufwiesen.

Frühpostoperative Messungen zur portalen Leberperfusion ergaben als Ursache eine fatale Hyperperfusion des verbleibenden Leberparenchyms, so daß die möglichen protektiven Effekte der IP-Vorbehandlung vollständig egalisiert wurden. Diese parenchymatöse Hyperperfusion wurde durch IP-Behandlung sogar tendentiell noch verstärkt und scheint unseres Erachtens der Grund für die reduzierte Proliferationsrate bei IP-behandelten Lebern zu sein.

Zusammenfassend gilt, daß sowohl die IP- als auch die MP-Behandlung die Ischämie/Reperfusionsschädigung nach warmer Leberischämie deutlich reduzieren können. Die Minderung des Ischämie/Reperfusionsschaden hatte jedoch keinen positiven Einfluß auf die nachfolgende Regeneration nach partieller Hepatektomie.

Im Zusammenhang mit der Steroidbedingten Leberkonditionierung scheint die Dosis des applizierten Glukokortikoids eine wichtige Rolle zu spielen. Demnach sind offensichtlich geringe Dosen geeignet, die Proliferationsrate im Rahmen der Regeneration zu erhöhen, während hohe Dosen diese eher supprimieren.

Für die IP-Behandlung gilt, daß bei größenreduzierten Lebern zwar die Ischämie/Reperfusionsschädigung reduziert wird, andererseits aber die Gefahr der postoperativen Hyperperfusion erhöht und damit das verbleibende Restparenchym nachhaltig geschädigt werden kann. Bei Leberresektionen scheint die IP-Behandlung das Problem der Mikrozirkulationsstörung im Sinne einer Aggravierung des Hyperperfusionssyndroms noch zu verstärken. Unter dem Strich werden damit die positiven Aspekte der IP-Behandlung im Sinne einer Protektion vor Ischämie/Reperfusionsschädigung neutralisiert. IP ist bei Leberresektionen folglich nur mit Vorbehalt zu empfehlen, es sollte immer das Ausmaß der Resektion und der verbleibenden Parenchymmasse mit in Betracht gezogen werden.

---

## Literaturverzeichnis

1. Almawi WY, Abou Jaoude MM, Li XC. Transcriptional and post-transcriptional mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects. *Hematol Oncol* 2002; 20: 17-32
2. Amersi F, Buelow R, Kato H, Ke B, Coito AJ, Shen X, Zhao D, Zaky J, Melinek J, Lassman CR, Kolls JK, Alam J, Ritter T, Volk HD, Farmer DG, Ghobrial RM, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Upregulation of heme oxygenase-1 protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 1999; 104: 1631-1639
3. Amsterdam A, Tajima K, Sasson R. Cell-specific regulation of apoptosis by glucocorticoids: implication to their anti-inflammatory action. *Biochem Pharmacol* 2002; 64: 843-850
4. Arai M, Thurman RG, Lemasters JJ. Contribution of adenosine A(2) receptors and cyclic adenosine monophosphate to protective ischemic preconditioning of sinusoidal endothelial cells against Storage/Reperfusion injury in rat livers. *Hepatology* 2000; 32: 297-302
5. Arai M, Thurman RG, Lemasters JJ. Ischemic preconditioning of rat livers against cold storage-reperfusion injury: role of nonparenchymal cells and the phenomenon of heterologous preconditioning. *Liver Transp* 2001; 7: 292-299
6. Arai S, Teramoto K, Kawamura T. Current progress in the understanding of and therapeutic strategies for ischemia and reperfusion injury of the liver. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2003; 10: 189-194

- 
7. Azzarone A, Francavilla A, Carrieri G, Gasbarrini A, Scotti-Foglieni C, Fagiuoli S, Cillo U, Zeng QH, Starzl TE. Effects of in vivo and in vitro hepatocyte proliferation of methylprednisolone, azathioprine, mycophenolate acid, mizoribine, and prostaglandine E1. *Transplant Proc* 1992; 2868-2871
  8. Barnes PJ. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clinical Science* 1998; 94: 557-572
  9. Belghiti J, Noun R, Malafosse R, Jagot P, Sauvanet A, Pierangeli F, Marty J, Farges O. Continuous versus intermittent portal triad clamping for liver resection. A controlled study. *Ann Surg* 1999; 3: 369-375
  10. Bilbao G, Contreras JL, Eckhoff DE, Mikheeva G, Krasnykh V, Douglas JT, Thomas FT, Thomas JM, Curiel DT. Reduction of ischemia-reperfusion injury of the liver by in vivo adenovirus-mediated gene transfer of the antiapoptotic Bcl-2 gene. *Ann Surg* 1999; 230: 185-193
  11. Bilzer M, Paumgartner G, Gerbes AL. Glutathione protects the rat liver against reperfusion injury after hypothermic preservation. *Gastroenterology* 1999; 117: 200-210
  12. Bilzer M, Gerbes AL. Preservation injury of the liver: mechanisms and novel therapeutic strategies. *J Hepatol* 2000; 32: 508-515
  13. Bismuth H, Castaing D, Garden J. Major hepatic resection under total vascular exclusion. *Ann Surg* 1989; 210: 13-19

- 
14. Blumhardt G, Ringe B, Bechstein WO, Pichlmayr R. Current clinical management of organoprotection in hepatic surgery. *Klin Wochenschr* 1986 (Suppl VII): 144-145
  15. Camargo CA, Madden JF, Gao W, Selvan RS, Clavien PA. Interleukin-6 protects liver against warm ischemia/reperfusion injury and promotes hepatocyte proliferation in the rodent. *Hepatology* 1997; 26: 1513-1520
  16. Carini R, De Cesaris MG, Splendore R, Vay D, Domenicotti C, Nitti MP, Paola D, Pronzato MA, Albano E. Signal pathway involved in the development of hypoxic preconditioning in rat hepatocytes. *Hepatology* 2001; 33: 131-139
  17. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-159
  18. Clavien PA, Harvey PRC, Strasberg SM. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts: Overview and synthesis of current studies. *Transplantation* 1992; 53: 957-978
  19. Clavien PA. Sinusoidal endothelial cell injury during hepatic preservation and reperfusion. *Hepatology* 1998; 28: 281-285
  20. Clavien PA, Yadav S, Sindram D, Bentley RC. Protective effects of ischemic preconditioning for liver resection performed under inflow occlusion in humans. *Ann Surg* 2000; 232: 155-162



- 
21. Clavien PA, Selzner M, Rudiger HA, et al. A prospective randomized study in 100 consecutive patients undergoing major liver resection with versus without ischemic preconditioning. *Ann Surg* 2003; 238: 843-850
  22. Colletti LM, Kunkel SL, Green M, Burdick M, Strieter RM. Shock. Hepatic inflammation following 70% hepatectomy may be related to up-regulation of epithelial neutrophil activating protein-78. *Shock* 1996; 6: 403-404
  23. Costas MA, Muller Igaz L, Holsboer F, Arzt E. Transrepression of NF-kappaB is not required for glucocorticoid-mediated protection of TNF-alpha-induced apoptosis on fibroblasts *Biochim Biophys Acta* 2000; 1499: 122-129
  24. Court FG, Wemyss-Holden SA, Dennison AR, Maddern GJ. The mystery of liver regeneration. *Br J Surg* 2002; 89: 1089-1095
  25. Ezaki T, Koyanagi N, Toyomasu T, Ikeda Y, Sugimachi K. Natural history of hepatectomy regarding liver function: a study of both normal livers and livers with chronic hepatitis and cirrhosis. *Hepatogastroenterol* 1998; 45: 1795-1801
  26. Downey JM, Liu GS, Thornton JD. Adenosine and the anti-infarct effects of preconditioning. *Cardiovasc Res* 1993; 27: 3-8
  27. Downey JM, Cohen MV, Ytrehus K, Liu Y. Cellular mechanisms in ischemic preconditioning: the role of adenosine and protein kinase C. *Ann NY Acad Sci* 1994; 723: 82-98

- 
28. Evans-Storms RB, Cidlowski JA. Delineation of an antiapoptotic action of glucocorticoids in hepatoma cells: the role of nuclear factor-kappaB. *Endocrinology* 2000; 141: 1854-1862
  29. Fausto N, Laird AD, Webber EM. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. *FASEB J* 1995; 9: 1527-1536
  30. Fausto N. Liver regeneration. *J Hepatol* 2000; 32 (S1):19-31
  31. Fausto N. Liver regeneration: From laboratory to clinic. *Liver Transplant* 2001; 10: 835-844
  32. Figueroa I, Santiago-Delpin EA. Steroid protection of the liver during experimental ischemia. *Surg Gynecol Obstet* 1975; 140: 368-370
  33. Fornander J, Hellman A, Hasselgren PO. Effects of methylprednisolone on protein synthesis and blood flow in the postischemic liver. *Circ Shock* 1984; 12: 287-295
  34. Fujioka T, Murakami M, Niiya T, Aoki T, Murai N, Enami Y, Kusano M. Effect of methylprednisolone on the kinetics of cytokines and liver function of regenerating liver in rats. *Hepatology Research* 2001; 19: 60-73
  35. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of the endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-376

- 
36. Gerlach C, Sakkab DY, Scholzen T, Daßler R, Alison MR, Gerdes J. Ki-67 expression during rat liver regeneration after partial hepatectomy. *Hepatology* 1997; 26: 573-578
  37. Glanemann M, Langrehr JM. Klinische Ergebnisse nach orthotoper Lebertransplantation in Abhängigkeit des Ischämie/Reperfusionsschaden. *Transplant Linc* 2001; 4(2): 58-66
  38. Glanemann M, Vollmar B, Nuessler AK, Schaefer T, Neuhaus P, Menger MD. Ischemic preconditioning protects from hepatic ischemia/reperfusion injury by preservation of microcirculation and mitochondrial redox state. *J Hepatol* 2003; 38: 59-66
  39. Glanemann M, Strenziok R, Kuntze R, Münchow S, Dikopoulos N, Lippek F, Langrehr JM, Dietel M, Neuhaus P, Nüssler AK. Ischemic preconditioning and methylprednisolone both equally reduce hepatic ischemia/reperfusion injury. *Surgery* 2004; 135: 203-214
  40. Granger DN, Korthuis RJ. Physiologic mechanisms of postischemic tissue injury. *Annu Rev Physiol* 1995; 57: 311-332.
  41. Gressner AM. Leber und Gallenwege. In: Greiling H, Gressner AM (Hrsg), *Lehrbuch der klinischen Chemie und Pathobiochemie*. Schattauer, Stuttgart/New York, 2. Auflage 1989; 421-464
  42. Hardy KJ, McClure DN, Subwongcharoen S. Ischaemic preconditioning of the liver: A preliminary study. *Aust NZJ Surg* 1996; 66: 707-710

- 
43. Hawaleshka A, Jacobsohn E. Ischaemic preconditioning: Mechanisms and potential clinical applications. *Can J Anaesth* 1998; 45: 670-682
  44. Heriot AG, Karanjia ND. A review of techniques for liver resection. *Ann R Coll Surg Engl* 2002; 84: 371-380
  45. Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol* 1931; 12: 186-202
  46. Hotter G, Closa D, Prados M, Fernandez-Cruz L, Prats N, Gelpi E, Rosello-Catafau J. Intestinal preconditioning is mediated by a transient increase in nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 222: 27-32
  47. Howell JG, Zibari GB, Brown MF, Burney DL, Sawaya DE, Olinde JG, Granger DN, McDonald JC. Both ischemic and pharmacological preconditioning decrease hepatic leukocyte/endothelial cell interactions. *Transplantation* 2000; 69: 300-303
  48. Ishida T, Yarimizu K, Gute DC, Korthuis RJ. Mechanisms of ischemic preconditioning. *Shock* 1997; 8: 86-94
  49. Ishii S, Abe T, Saito T, Tsuchiya T, Kanno H, Miyazawa M, Suzuki M, Motoki R, Gotoh M. Effects of preconditioning on ischemia/reperfusion injury of hepatocytes determined by immediate early gene transcription. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2001; 8: 461-468

- 
50. Iu S, Harvey PR, Makowka L, Petrunka CN, Ilson RG, Strasberg SM. Markers of allograft viability in the rat. Relationship between transplantation viability and liver function in the isolated perfused liver. *Transplantation* 1987; 44: 562-569
  51. Jaeschke H, Farhood A. Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver *Am J Physiol* 1991; 260: G355-G362
  52. Jaeschke H, Farhood A, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ, Smith CW. Functional inactivation of neutrophils with a Mac-1 (CD11b/CD18) antibody protects against ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Hepatology* 1993; 17: 915-923
  53. Jaeschke H. Preservation injury: mechanisms, prevention and consequences. *J Hepatol* 1996; 25: 774-780
  54. Jaeschke H. Cellular adhesion molecules: regulation and functional significance in the pathogenesis of liver diseases. *Am J Physiol* 1997; 273: G602-G611
  55. Jaeschke H, Lemasters JJ. Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Gastroenterology* 2003; 125: 1246-1257
  56. Kim YI, Salvini P, Auxilia F, Calne RY. Effect of cyclosporine A on hepatocyte proliferation after partial hepatectomy in rats: Comparison with standard immunosuppressive agents. *Am J Surgery* 1988; 155: 245-249
  57. Kim YI. Ischemia-reperfusion injury of the human liver during hepatic resection. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2003; 10: 195-199

- 
58. Kita Y, Takashi T, Ligo Y, Tamatani T, Miyasaka M, Horiuchi T. Sequence and expression of rat ICAM-1. *Biochem Biophys Acta* 1992; 1131: 108-110
  59. Kobayashi H, Nonami T, Kurokawa T, Takeuchi Y, Harada A, Nakano A, Takagi H. Role of endogeneous nitric oxide in ischemia-reperfusion injury in rat liver. *J Surg Res* 1995; 59; 772-779
  60. Kountouras J, Boura P, Lygidakis NJ. Liver regeneration after hepatectomy. *Hepato-Gastroenterology* 2001; 48: 556-562
  61. Kooby DA, Stockman J, Ben-Porat L, Gonen M, Jarnagin WR, Dematteo RP, Tuorto S, Wuest D, Blumgart LH, Fong Y. Influence of transfusions on perioperative and long-term outcome in patients following hepatic resection for colorectal metastases. *Ann Surg* 2003; 237: 860-869
  62. Korthuis RJ, Gute DC, Cepinskas G, Kvietys PR. Cellular mechanisms of acute versus delayed preconditioning. *Pathophysiology* 1998; 5: 35-48
  63. Kubes P, Kurose I, Granger DN. NO donors prevent integrin-induced leukocyte adhesion, but not P-selectin dependent rolling in postischemic venules. *Am J Physiol* 1994; 267: H931-H937
  64. Kubes P. The role of adhesion molecules and nitric oxide in intestinal and hepatic ischemia/reperfusion. *Hepato-Gastroenterology* 1999; 46: 1458-1463

- 
65. Kume M, Yamamoto Y, Saad S. Ischemia preconditioning of the liver in rats: Implications of heat shock protein induction to increase tolerance of ischemia-reperfusion injury. *J Lab Clin Med.* 1996; 128: 251-258
  66. Kuzume M, Nakano H, Yamaguchi M, Matsumiya A, Shimokohbe G, Kitamura N, Nagasaki H, Kumada K. A monoclonal antibody against ICAM-1 suppresses hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Eur Surg Res* 1997; 29: 93-100
  67. LaBrecque D. Liver regeneration: a picture emerges from the puzzle. *Am J Gastroenterol* 1994; 89 (Suppl): S86-S96
  68. Lemasters JJ, Thurman RG. Reperfusion injury after liver preservation for transplantation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997; 37: 327-338
  69. Lentsch AB, Kato A, Yoshidome H, McMasters KM, Edwards MJ. Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* 2000; 32: 169-173
  70. Lloris-Carsi JM, Cejalvo D, Toledo-Pereyra LH, Calvo MA, Suzuki S. Preconditioning: effect upon lesion modulation in warm liver ischemia. *Transplant Proc* 1993;25:3303-3304
  71. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275

- 
72. Luss H, DiSilvio M, Litton AL, Molina y Vedia L, Nussler AK, Billiar TR. Inhibition of nitric oxide synthesis enhances the expression of inducible nitric oxide synthase mRNA and protein in a model of chronic liver inflammation. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 204: 635-640
  73. Magnall D, Bird NC, Majeed AW. The molecular physiology of liver regeneration following partial hepatectomy. *Liver* 2003; 23: 124-138
  74. Makuuchi M, Takayama T, Gunven P, Kosige T, Yamazaki S, Hasegawa H. Restrictive versus liberal blood transfusion policy for hepatectomies in cirrhotic patients. *World J Surg* 1989; 13: 644-648
  75. Man DV, Lam WW, Hjelm NM, So NM, Yeung DK, Metreweli C, Lau WY. Human liver regeneration: hepatic energy economy is less efficient when the organ is diseased. *Hepatology* 2001; 34: 557-565
  76. Man K, Lo CM, Ng IO, Wong YC, Qin LF, Fan ST, Wong J. Liver transplantation in rats using small-for-size grafts: a study of hemodynamic and morphological changes. *Arch Surg* 2001; 136: 280-285
  77. Man K, Fan ST, Lo CM, Liu CL, Fung PC, Liang TB, Lee TK, Tsui SH, Ng IO, Zhang ZW, Wong J. Graft injury in relation to graft size in right lobe live donor liver transplantation: a study of hepatic sinusoidal injury in correlation with portal hemodynamics and intragraft gene expression. *Ann Surg* 2003; 237: 256-264



- 
78. Marcos A, Olzinski AT, Ham JM, et al. The interrelationship between portal and arterial blood flow after adult to adult living donor liver transplantation. *Transplantation* 2000; 70: 1697-1703
  79. Martinez-Mier G, Toledo-Pereyra LH, Ward PA. Adhesion molecules in liver ischemia and reperfusion. *Journal of Surgical Research* 2000; 94: 185-194
  80. McCallion K, Wattanasirichaigoon S, Gardiner KR, Fink MP. Ischemic preconditioning ameliorates ischemia- and reperfusion-induced intestinal epithelial hyperpermeability in rats. *Shock*. 2000; 14: 429-434
  81. Menger MD, Richter S, Yamauchi J, Vollmar B. Role of microcirculation in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* 1999; 46 (S2): 1452-1457
  82. Morita T, Togo S, Kubota T, Kamimukai N, Nishizuka I, Kobayashi M, Ichikawa Y, Ishikawa T, Takahashi S, Matsuo K, Tomaru Y, Okazaki Y, Hayashizaki Y, Shimada H. Mechanism of postoperative liver failure after excessive hepatectomy investigated using a cDNA microarray. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002; 9: 352-359
  83. Motoyama S, Saito S, Minamiya Y, Saito R, Nakamura M, Okuyama M, Imano H, Ogawa J. Methylprednisolone inhibits low-flow hypoxia-induced mitochondrial dysfunction in isolated perfused rat liver. *Crit Care Med* 2003; 31: 1468-1474
  84. Mueller AR, Platz KP, Haak M, Undi H, Muller C, Kottgen E, Weidemann H, Neuhaus P. The release of cytokines, adhesion molecules, and extracellular matrix parameters

- 
- during and after reperfusion in human liver transplantation. *Transplantation* 1996; 62: 1118-1126
85. Muratore A, Ribero D, Ferrero A, Bergero R, Capussotti L. Prospective randomized study of steroids in the prevention of ischaemic injury during hepatic resection with pedicle clamping. *Br J Surg* 2003; 90: 17-22
86. Murrey CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74: 1124-1136
87. Nadal C. Dose-related opposite effects of hydrocortisone on hepatocyte proliferation in the rat. *Liver* 1995; 15: 63-69
88. Nagino M, Kamiya J, Uesaka K, Sano T, Yamamoto H, Hayakawa N, Kanai M, Nimura Y. Complications of hepatectomy for hilar cholangiocarcinoma. *World J Surg* 2001; 25: 1277-1283
89. Nagy P, Kiss A, Schnur J, Thorgeirsson SS. Dexamethasone inhibits the proliferation of hepatocytes and oval cells but not bile duct cells in rat liver. *Hepatology* 1998; 28: 423-429
90. Nakayama H, Yamamoto Y, Kume M, Yamagami K, Yamamoto H, Kimoto S, Ishikawa Y, Ozaki N, Shimahara Y, Yamaoka Y. Pharmacologic stimulation of adenosine A2 receptor supplants ischemic preconditioning in providing ischemic tolerance in rat livers. *Surgery* 1999; 126: 945-954

- 
91. Nilsson B, Friman S, Gustafsson BI, Delbro DS. Preconditioning protects against ischemia/reperfusion injury of the liver. *J Gastrointest Surg* 2000; 4: 44-49
  92. Nudel U, Zakut R, Shani M, Neuman S, Levy Z, Yaffe D. The nucleotide sequence of the rat cytoplasmatic beta-actin gene. *Nucleic Acids Res* 1983; 11: 1759-1771
  93. Nussler AK, Billiar TR. Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J Leukoc Biol* 1993; 54: 171-178
  94. Nussler AK, Beger HG, Liu ZZ, Billiar TR. Nitric oxide, hepatocytes and inflammation. *Res Immunol* 1995; 146: 671-677
  95. Ogawa T, Mimura Y, Kanauchi H, Nakamura T, Hiki Y, Kojima J, Kaminishi M. Ischemic preconditioning improves functional damage following prolonged ischemia-reperfusion in the rats kidney. *J J Metab Nutri* 1998; 72: 117-118
  96. Ormrod DJ, Harrison GL, Miller TE. Inhibition of neutrophil myeloperoxidase activity by selected tissues. *J Pharmacol Methods* 1987; 18: 137-142.
  97. Pachter HL, Spencer FC. Recent concepts in the treatment of hepatic trauma. *Ann Surg* 1979; 190: 423-429
  98. Pachter HL, Spencer FC, Hofstetter SR, Liang HG, Coppa GF. Significant trends in the treatment of hepatic trauma. *Ann Surg* 1991; 215: 492-502

- 
99. Pearl JM, Nelson DP, Schwartz SM, Wagner CJ, Bauer SM, Setser EA, Duffy JY. Glukokorticoids reduce ischemia-reperfusion-induced myocardial apoptosis in immature hearts. *Ann Thorac Surg* 2002; 74: 830-836
  100. Peralta C, Closa D, Hotter G, Gelpi E, Prats N, Rosello-Catafau J. Liver ischemic preconditioning is mediated by the inhibitory action of nitric oxide on endothelin. *Biochem Res Commun* 1996; 229: 264-269
  101. Peralta C, Hotter G, Closa D, Gelpi E, Bulbena O, Rosello-Catafau J. Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion in the rat: Role of nitric oxid and adenosine. *Hepatology* 1997; 25: 934-937
  102. Peralta C, Closa D, Xaus C, Gelpi E, Rosello-Catafau J, Hotter G. Hepatic preconditioning in rats is defined by a balance of adenosine and xanthine. *Hepatology* 1998; 28: 768-773
  103. Peralta C, Hotter G, Closa D, Prats N, Xaus C, Gelpi E, Rosello-Catafau J. The protective role of adenosine in inducing nitric oxide synthesis in rat liver ischemia preconditioning is mediated by activation of adenosine A<sub>2</sub> receptors. *Hepatology* 1999; 29: 126-132
  104. Peralta C, Bartrons R, Serafin A, Blazquez C, Guzman M, Prats N, Xaus C, Cutillas B, Gelpi E, Rosello-Catafau J. Adenosine monophosphate-activated protein kinase mediates the protective effects of ischemic preconditioning on hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Hepatology* 2001; 34: 1164-1173

- 
105. Peralta C, Bartrons R, Riera L, Manzano A, Xaus C, Gelpi E, Rosello-Catafau J. Hepatic preconditioning preserves energy metabolism during sustained ischemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: G163-G171
106. Peralta C, Fernandez L, Panes J, Prats N, Sans M, Pique JM, Gelpi E, Rosello-Catafau J. Preconditioning protects against systemic disorders associated with hepatic ischemia-reperfusion through blockade of tumor necrosis factor-induced P-selectin up-regulation in the rat. *Hepatology* 2001; 33: 100-113
107. Pringle JH. Notes on the arrest of hepatic hemorrhage due to trauma. *Ann Surg* 1908; 48: 541-549
108. Reutzel-Selke A, Zschockelt T, Denecke C, Bachmann U, Jurisch A, Pratschke J, Schmidbauer G, Volk HD, Neuhaus P, Tullius SG. Short-term immunosuppressive treatment of the donor ameliorates consequences of ischemia/ reperfusion injury and long-term graft function in renal allografts from older donors. *Transplantation* 2003; 75: 1786-1792
109. Richter S, Vollmar B, Mucke I, Post S, Menger MD. Hepatic arteriolo-portal venular shunting guarantees maintenance of nutritional microvascular supply in hepatic arterial buffer response of rat livers. *J Physiol* 2001; 531: 193-201
110. Rüdiger HA, Kang KJ, Sindram D, Riehle HM, Clavien PA. Comparison of ischemic preconditioning and continuous inflow occlusion in the murine liver. *Ann Surg* 2002; 235: 400-407

- 
111. Santiago-Delpin EA, Figueroa I, Lopez R, Vazquez J. Protective effect of steroids on liver ischemia. *Am Surg* 1975; 41: 683-695
112. Sawaya DE Jr, Brown M, Minardi A, Bilton B, Burney D, Granger DN, McDonald JC, Zibari GB. The role of ischemic preconditioning in the recruitment of rolling and adherent leukocytes in hepatic venules after ischemia/reperfusion. *J Surg Res* 1999; 85: 163-170
113. Scarpulla RC, Agne KM, Wu R. Isolation and structure of a rat cytochrome c gene. *J Biol Chem* 1981; 256: 6480-6486
114. Schmid RM, Liptay S, Betts JC, Nabel GJ. Structural and functional analysis of NF $\kappa$ B. *J Biol Chem* 1994; 269: 32162-32167
115. Schott RJ, Rohmann S, Braun ER, Schaper W. Ischemic preconditioning reduces infarct size in swine myocardium. *Circ Res* 1990; 66: 1133-1142
116. Scott RJ, Rohmann S, Braun ER, Schaper W. Ischemic preconditioning reduces infarct size in swine myocardium. *Circ Res* 1992; 66: 1133-1138
117. Seiler CA, Redaelli C, Schmied BM, Baer HU, Buchler MW. Liver resection for liver metastases-1998 Bern Symposium. *Swiss Surg* 2000; 6: 164-168
118. Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg* 2001; 181: 160-166

- 
119. Shaked A, Nunes FA, Olthoff KM, Lucey MR. Assessment of liver function: pre- and peritransplant evaluation. *Clinical Chemistry* 1997; 43: 1539-1545
  120. Shimada M, Saitoh A, Kano T, Takenaka K, Sugimachi K. The effect of perioperative steroid pulse on surgical stress in hepatic resection. *Int Surg* 1996; 81: 49-51
  121. Steinle AU, Weidenbach H, Wagner M, Adler G, Schmid RM. NF $\kappa$ B/Rel activation in cerulein pancreatitis. *Gastroenterology* 1999; 116: 420-430
  122. Strasberg SM, Howard TK, Molmenti EP, Hertl M. Selecting the donor liver: risk factors for poor function after orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 1994; 20: 829-838
  123. Streetz KL, Luedde T, Manns MP, Trautwein C. Interleukin 6 and liver regeneration. *Gut* 2000; 47: 309-312
  124. Takahira R, Yonemura K, Fujise Y, Hishida A. Dexamethasone attenuates neutrophil infiltration in the rat kidney in ischemia/reperfusion injury: the possible role of nitroxyl. *Free Radic Biol Med* 2001; 31: 809-815
  125. Takeda K, Togo S, Kunihiro O, Fujii Y, Kurosawa H, Tanaka K, Enno I, Takimoto A, Sekido H, Hara M, Shimada H. Clinicohistological features of liver failure after excessive hepatectomy. *Hepatogastroenterology* 2002; 49: 354-358

- 
126. Teoh N, Dela Pena A, Farrell G. Hepatic ischemic preconditioning in mice is associated with activation of NF-kappaB, p38 kinase, and cell cycle entry. *Hepatology* 2002; 36: 94-102
  127. Teoh NC, Farrell GC. Hepatic ischemia reperfusion injury: Pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 891-902
  128. Thornton JD, Thornton CS, Sterling DL, Downey JM. Blockade of ATP-sensitive potassium channels increases infarct size but does not prevent preconditioning in rabbit hearts. *Circ Res* 1993; 72: 44-49
  129. Torzilli G, Makuuchi M, Inoue K. The vascular control in liver resection: revisitation of a controversial issue. *Hepatogastroenterology* 2002; 49: 28-31
  130. Troisi R, de Hemptinne B. Clinical relevance of adapting portal vein flow in living donor liver transplantation in adult patients. *Liver Transpl.* 2003; 9: S36-41
  131. Vajdova K, Heinrich S, Tian Y, Graf R, Clavien PA. Ischemic preconditioning and intermittent clamping improve murine hepatic microcirculation and Kupffer cell function after ischemic injury. *Liver Transpl* 2004; 10: 520-528
  132. Valen G, Kawakami T, Tahepold P et al. Pretreatment with methylprednisolone protects the isolated rat heart against ischemic and oxidative damage. *Free Radic Res* 2000; 33: 31-43



- 
133. Van Winkle DM, Chien GL, Wolff RA, Doiffer BE, Kuzume K, Davis RF. Cardioprotection provided by adenosine receptor activation is abolished by blockade of the KATP channel. *Am J Physiol* 1994; 266: H892-H898
134. Vollmar B, Menger MD, Glasz J, Leiderer R, Messmer K. Impact of leukocyte-endothelial cell interaction in hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1994; 267: G786-G793
135. Vollmar B, Burkhardt M, Minor T, Klauke H, Menger MD. High-resolution microscopic determination of hepatic NADH fluorescence for *in vivo* monitoring of tissue oxygenation during hemorrhagic shock and resuscitation. *Microvasc Res* 1997; 54:164-73.
136. Wang M, Sakon M, Umeshita K, Okuyama M, Shiozaki K, Nagano H, Dohno K, Nakamori S, Monden M. Prednisolone suppresses ischemia-reperfusion injury of the rat liver by reducing cytokine production and calpain  $\mu$  activation, *J Hepatol* 2001; 34: 278-283
137. Wei C, Tung-Ping Poon R, Fan ST, Wong J. Risk factor for perioperative morbidity and mortality after extended hepatectomy for hepatocellular carcinoma. *Br J Surg* 2003; 90: 33-41
138. Yadav SS, Howell DN, Gao W, Steeber DA, Harland RC, Clavien PA. L-selectin and ICAM-1 mediate reperfusion injury and neutrophil adhesion in the warm ischemic mouse liver. *Am J Physiol* 1997; 275: G1341-G1352

- 
139. Yadav SS, Sindram D, Perry DK, Clavien PA. Ischemic preconditioning protects the mouse liver by inhibition of apoptosis through a caspase-dependent pathway. *Hepatology* 1999; 30: 1223-1231
140. Yamashita Y, Shimada M, Hamatsu T, Rikimaru T, Tanaka S, Shirabe K, Sugimachi K. Effects of preoperative steroid administration on surgical stress in hepatic resection. *Arch Surg* 2001; 136: 328-333
141. Yeh KY, Yeh M, Glass J, Granger DN. Rapid activation of NF $\kappa$ B and AP-1 and target gene expression in postischemic intestine. *Gastroenterol* 2000; 118: 525-534
142. Yellon DM, Alkhulaifi AM, Browne EE, Pugsley WB. Ischaemic preconditioning limits infarct size in the rat heart. *Cardiovasc Res* 1992; 26: 983-987
143. Yin DP, Sankary HN, Chong AS, Ma LL, Shen J, Foster P, Williams JW. Protective effect of ischemic preconditioning on liver preservation-reperfusion injury in rats. *Transplantation* 1998; 66: 152-157
144. Yoshizumi T, Yanaga K, Soejima Y, Maeda T, Uchiyama H, Sugimachi K. Amelioration of liver injury by ischaemic preconditioning. *Br J Surg* 1998; 85: 1636-1640

**Danksagung**

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof Dr. med. Peter Neuhaus, der mir im Laufe der Jahre eine hervorragende chirurgische Ausbildung in seiner Klinik ermöglicht hat. Ohne seine uneingeschränkte Förderung und Unterstützung wäre die Fertigstellung dieser Habilitationsschrift nicht möglich gewesen.

Besonderer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. rer nat. Andreas K. Nüssler, der mir die Grundlagen der experimentellen Forschung nähergebracht hat und darüberhinaus auch durch seinen unermüdlichen persönlichen Einsatz diese Arbeit hat Wirklichkeit werden lassen.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Herrn PD Dr. med. Jan M. Langrehr, der mich seit Beginn meiner Promotion in all meinen wissenschaftlichen und chirurgischen Aktivitäten mit Rat und Tat unterstützt hat.

Ein Dankeschön geht an alle Kollegen (PD Dr. med. Hussein Al-Abadi, PD Dr. med. Ulf Neumann), technischen Assistenten (Anja Schirmeier, Ikonja Rotter, Evelyn Hungerbühler, Dietrich Polenz) sowie Doktoranden (Robert Kuntze, Romy Strenziok, Simone Münchow), die mir mit ihrem Wissen und Einsatz bei der Umsetzung der Experimente geholfen haben.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Frau, Dr. med. Barbara Stange, für ihr Verständnis und ihre Geduld danken, die sie mir während der Fertigstellung dieser Arbeit entgegengebracht hat, da doch einige Abende bzw. Wochenenden im Labor und vor dem Computer erforderlich waren, anstatt den schönen Dingen des Lebens zu frönen.

## **EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG**

gemäß Habilitationsordnung der Medizinischen Fakultät Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren gegen mich anhängig sind,
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte;
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....  
Datum

.....  
Unterschrift